UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MYCOBACTÉRIOPHAGES

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

JEAN-DANIEL PIGUET
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

1960

Yverdon
Imprimerie des Remparts S. A.
1961

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MYCOBACTÉRIOPHAGES

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

JEAN-DANIEL PIGUET
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Yverdon
Imprimerie des Remparts S. A.
1961

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
FACULTÉ DES SCIENCES

IMPRIMATUR

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de *MM. le prof. P. Hauduroy, directeur de thèse, M. R. Regamey, chargé de cours, M. le prof. L. Fauconnet et M. le prof. J. de Beaumont, doyen,* le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Monsieur Jean-Daniel PIGUET

intitulée : *« Contribution à l'étude des mycobactériophages »*.

Lausanne, le 4 novembre 1960.

Le doyen de la Faculté des Sciences :
J. de Beaumont.

A mes parents

Nous tenons à remercier vivement ceux dont l'aide ou les conseils nous ont été précieux au cours de la préparation de cette thèse, et tout particulièrement M. le Prof. Paul Hauduroy, directeur de thèse, M. Hans Gaschen, chargé de cours de parasitologie, M. Willy Rosset, chef du service des Analyses, M. Alain Gautier, chef du Centre de Microscopie Electronique et M. le Prof. E. Kellenberger, directeur du Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

INTRODUCTION

Depuis une quinzaine d'années, divers auteurs ont isolé à partir de lésions humaines des mycobactéries qui diffèrent par de nombreux points des bacilles tuberculeux ; elles sont souvent pigmentées, elles poussent relativement rapidement, leur pouvoir pathogène vis-à-vis du cobaye est faible ou même nul. Enfin, les lésions qu'elles provoquent chez l'homme sont parfois différentes de celles qui sont dues aux bacilles tuberculeux authentiques.

Appelées tantôt « anormales » [**1**], tantôt « atypiques » [**2**], ces mycobactéries attirent de plus en plus l'attention des bactériologues, et le nombre de souches isolées à l'heure actuelle est considérable.

Les enquêtes qui sont menées actuellement en vue de déterminer la proportion de ces mycobactéries atypiques donnent des résultats très différents, parce que les caractéristiques mêmes des mycobactéries atypiques ne sont pas définies d'une manière satisfaisante. On appelle généralement « atypiques » toutes les mycobactéries qui sont pathogènes pour l'homme, mais qui, par un caractère ou par un autre, sont différentes des bacilles tuberculeux authentiques.

Le groupe des mycobactéries atypiques est donc très vaste, et on y range des bactéries très différentes. Cette diversité n'est pas sans rappeler le groupe des bacilles dits « paratuberculeux », qui contient des germes qui n'ont de commun que l'acido-alcoolo-résistance, caractère lui-même assez instable.

La classification des mycobactéries, telle qu'elle est employée à l'heure actuelle, ne permet pas de ranger de façon satisfaisante les mycobactéries atypiques. Nous rappellerons brièvement cette classification [**3**] :

L'ordre des *Actinomycetales* comprend trois familles, parmi lesquelles celle des *Mycobacteriaceae ;* les bactéries appartenant à cette famille sont caractérisées par un mycélium rudimentaire ou absent ; elles ne forment pas de spores et sont acido-résistantes. La famille des *Mycobacteriaceae* ne comprend qu'un seul genre, *Mycobacterium ;* enfin, le genre *Mycobacterium* est formé de 14 espèces différentes.

L'auteur en possession d'une souche de mycobactéries devrait pouvoir la ranger dans l'une ou l'autre de ces espèces. Ce n'est malheureusement pas toujours possible. En effet, si certaines espèces sont faciles à identifier, d'autres le sont moins, et les souches nouvellement isolées possèdent quelquefois des caractères atypiques qui rendent impossible toute

classification. Les mycobactéries « anormales » et la plupart des bacilles paratuberculeux sont dans ce cas.

Un autre problème se pose au bactériologue qui a isolé une souche nouvelle : il aimerait savoir si cette souche est pathogène ou non pour l'homme, et, dans le cas où elle a été isolée d'une lésion humaine, si c'est bien elle qui est à l'origine de cette lésion.

Le pouvoir pathogène est difficile à déterminer. L'expérimentation sur l'homme est impossible ; les singes sont des animaux coûteux et peu commodes à manipuler ; le cobaye est employé universellement, mais on sait que de nombreuses souches (les souches atypiques) sont pathogènes à des degrés variables pour l'homme, et sont cependant incapables de tuberculiser le cobaye.

L'emploi de « tests de virulence » devrait, en principe, permettre de distinguer les bacilles virulents des non-virulents. Ces tests ont un grand intérêt, mais les résultats qu'ils donnent doivent être interprétés avec la plus grande prudence.

Les plus connus sont ceux de Dubos [**4**], de Desbordes [**5**], de Wilson, Kalish et Fish [**6**], la coloration d'Alexander [**7**], la présence ou l'absence de « cordes » [**8**], le test de la catalase [**9**], le test de la nyacine [**10**]. Le fait qu'ils donnent des résultats souvent différents montrent qu'ils ne sont pas infaillibles.

Nous n'avons donc pas à notre disposition de classification satisfaisante des mycobactéries. Actuellement, on tente de divers côtés d'établir une classification où toutes les mycobactéries pourraient trouver leur place, ce qui est loin d'être le cas maintenant.

Une des tentatives de classification les plus intéressantes est celle qui est basée sur la typisation par les bactériophages. Cette technique, mise au point pour des germes appartenant aux genres *Salmonella, Shigella, Staphylococcus,* etc., est applicable théoriquement à toutes les bactéries pour lesquelles on possède des bactériophages spécifiques. Nous reviendrons en détail sur cette technique dans une autre partie de ce travail ; nous en indiquerons cependant ici brièvement le principe.

La typisation par les bactériophages ou lysotypie (phage-typing) est due à Sonnenschein [**11**]. Elle est basée sur le fait qu'un bactériophage, s'il est capable de lyser les bactéries appartenant à une espèce donnée, ne peut cependant pas lyser toutes les souches de cette espèce.

Un exemple fera mieux comprendre comment on arrive à classer des bactéries au moyen de bactériophages.

Supposons que nous ayons entre les mains un certain nombre de souches de *Salmonella typhi,* identifiées au préalable grâce à leurs propriétés biochimiques et à leur pouvoir antigénique. A ces deux points de vue, ces souches sont toutes semblables entre elles. Mais l'emploi de la lysotypie va nous permettre de faire un classement plus précis.

Il faut se procurer quelques bactériophages anti-*Salmonella typhi.* Chacun d'entre eux ne pourra pas lyser toutes les souches de *S. typhi* que nous voulons classer. Au contraire, chacun aura son spectre d'action bien déterminé. Certaines souches bactériennes seront lysables par tous

les phages, d'autres ne le seront que par quelques-uns d'entre eux ; d'autres, enfin, seront résistantes à tous les phages.

On classera alors dans un même groupe toutes les souches de *S. typhi* ayant exactement le même comportement vis-à-vis des bactériophages utilisés. Si l'on isole une nouvelle souche de *S. typhi,* il suffira de la soumettre à l'action de la série de bactériophages ; on pourra soit la faire entrer dans un groupe déjà existant, soit former un nouveau groupe, si le comportement de cette souche vis-à-vis des divers phages est différent de ceux qui ont déjà été observés.

Signalons encore un fait important : plus le nombre de bactériophages utilisés pour la typisation est grand, plus grande est la précision de la classification. Il est évident que pour obtenir une classification valable, la méthode doit être standardisée, et les phages employés doivent être les mêmes dans tous les laboratoires.

On voit immédiatement l'intérêt d'une telle méthode.

Chez les *Salmonella,* en particulier, elle est employée avec succès. Comme la classification sérologique donne d'excellents résultats chez ces germes, la lysotypie n'est utilisée que dans des buts épidémiologiques.

Dans le groupe des mycobactéries, par contre, où aucune classification sérologique n'est possible pour le moment, la lysotypie présente le plus grand intérêt.

Depuis la découverte de bactériophages actifs sur ces bactéries, divers essais de lysotypie ont été pratiqués, en particulier par Penso et Ortali [**12**]. Froman [**13**] est en train actuellement de mettre au point une technique de lysotypie applicable aux mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux. L'utilisation de 14 bactériophages différents a déjà permis à cet auteur de classer en 20 groupes les souches de mycobactéries qu'il a étudiées. Ce début est extrêmement prometteur.

Comme nous l'avons dit précédemment, il est nécessaire, pour établir une classification précise au moyen de la typisation, de posséder le plus grand nombre de bactériophages ; ces bactériophages doivent être bien entendu différents les uns des autres ; ils doivent d'autre part posséder si possible une spécificité élevée, c'est-à-dire n'attaquer chacun qu'un nombre relativement restreint de souches de mycobactéries.

Les buts que nous nous sommes proposé d'atteindre dans cette étude sont les suivants :

1) Recherche de mycobactériophages par différentes techniques et dans des produits d'origines diverses.

2) Etude du ou des bactériophages isolés vis-à-vis d'un certain nombre de mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux.

3) Etude de la possibilité d'employer ces nouveaux phages dans un système de lysotypie.

Un bref rappel de l'histoire de la découverte du bactériophage par d'Herelle, puis des mycobactériophages par divers auteurs, permettra de se rendre compte de l'évolution rapide de nos connaissances sur ces micro-organismes.

Histoire des bactériophages, et plus particulièrement des mycobactériophages

En 1915, Twort [**14**] décrivit pour la première fois la lyse transmissible des bactéries. Il avait en effet observé que dans certaines conditions, des cultures de germes du genre *Micrococcus* s'éclaircissaient, et que le facteur, encore inconnu, de cet éclaircissement, pouvait être inoculé à une autre culture, qui allait se lyser à son tour. L'opération pouvait être répétée aussi souvent qu'on le voulait, sans que le facteur responsable perdît de son activité. Twort remarqua en outre que ce facteur se multipliait en présence de *Micrococcus*. L'auteur se montra très réservé dans ses conclusions ; comme le but de ses recherches était précisément d'isoler des virus filtrables non pathogènes, Twort émit l'hypothèse que son facteur lytique était un virus provoquant la destruction des microcoques, et qu'il pouvait être la cause d'une véritable maladie infectieuse de ces microbes. Après avoir passé en revue une série d'autres possibilités d'explication (bactéries très petites, ou genre d'amibes ne pouvant se développer qu'en présence de matière vivante, ou protoplasme vivant sans forme déterminée, ou encore enzyme ayant le pouvoir de se reproduire), Twort insista sur le fait que rien ne permettait d'exclure la possibilité que ce facteur fût un virus invisible.

Twort était donc très près de découvrir la nature exacte du principe qu'il avait isolé (et qui était très vraisemblablement du bactériophage) ; des difficultés financières l'empêchèrent malheureusement de continuer ses recherches comme il l'aurait voulu.

La communication de Twort passa inaperçue, en particulier à cause de la guerre, et quand, en 1917, d'Hérelle [**15**] signala l'existence d'un « microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques », il s'agissait de la véritable découverte du bactériophage.

D'Hérelle se consacra alors entièrement à l'étude du bactériophage, et ses recherches furent couronnées de succès.

En 1921 déjà, dans un ouvrage consacré à ses travaux sur le bactériophage [**16**], d'Hérelle décrivait la plupart des propriétés de ce virus, telles la filtrabilité, l'exaltation de la virulence, la numération des phages au moyen des plages claires, les conditions nécessaires à la multiplication du virus, les cultures secondaires, le principe de la typisation, la sensibilité aux agents physiques et chimiques, le pouvoir antigénique et le rôle que le bactériophage peut jouer dans l'évolution de certaines maladies, en particulier lors des dysenteries bacillaires.

A ce moment déjà, d'Hérelle signale l'existence de bactériophages actifs sur les bacilles dysentériques, les bacilles typhiques et paratyphiques, les colibacilles, les *Proteus*, les bacilles diphtériques non pathogènes, les staphylocoques, les bactéries du barbone et de la flacherie, les bacilles pesteux, les *Bac. subtilis* et les vibrions cholériques.

En constatant l'existence de bactériophages actifs sur des germes

si différents, on était en droit de se demander si chaque espèce bactérienne ne possédait pas son propre bactériophage.

La possibilité de l'existence de mycobactériophages a dû être envisagée par de nombreux chercheurs, et en 1938, par exemple, VARRIER-JONES [**17**] émit l'hypothèse qu'il existait un bactériophage actif sur les bacilles tuberculeux.

Ayant remarqué que dans les régions où le zinc est abondant, la tuberculose est moins active que dans les régions où cet élément fait défaut, ou tout au moins est rare, Varrier-Jones pensait que le fait pouvait s'expliquer par l'existence d'un bactériophage capable de lyser les bacilles tuberculeux, et dont la croissance était stimulée par le zinc. Cette explication ne fut pas confirmée, et on ne put montrer l'existence d'un tel phage dans ces régions.

Ce n'est qu'en 1947 que deux auteurs, GARDNER et WEISER [**18**], isolèrent de la terre un bactériophage actif sur *Mycobacterium smegmatis*. La preuve de l'existence d'un mycobactériophage étant ainsi apportée, divers auteurs isolèrent à leur tour des bactériophages actifs sur certaines mycobactéries, en employant des techniques sur lesquelles nous reviendrons.

HAUDUROY et ROSSET en 1948 [**19**], ORTALI en 1948 [**20**], PENSO et ORTALI en 1949 [**21**], WHITTAKER en 1950 [**22**], HNAKTO en 1951 [**23**], MCLAREN en 1953 [**24**] isolent des bactériophages actifs sur des mycobactéries non pathogènes. Malgré les essais répétés de plusieurs de ces auteurs, aucun des bactériophages isolés ne se montra capable de lyser les bacilles tuberculeux authentiques.

En 1953, pour la première fois, FROMAN et BOGEN [**25**] isolent deux bactériophages qui attaquent non seulement un grand nombre de mycobactéries saprophytes, mais encore des bacilles tuberculeux humains et bovins.

Par la suite, un certain nombre d'auteurs ont encore isolé des mycobactériophages attaquant soit des germes saprophytes, soit des germes pathogènes : MACANDER en 1954 [**26**], CHORÉMIS et coll. en 1955 [**27**] ; en 1957, TAKEYA et YOSHIMURA [**28**] isolent 4 souches de bactériophages attaquant, en plus des mycobactéries saprophytes et des bacilles tuberculeux humains et bovins, les bacilles tuberculeux aviaires et murins. Signalons encore les isolements faits par VANDRA et GÁL en 1958 [**29**], et par HIKAWA en 1959 [**30**].

Techniques générales employées pour l'étude des mycobactériophages

Nous décrivons dans ce chapitre les milieux de culture et les techniques générales que nous avons utilisés au cours de nos essais. Les techniques et les milieux employés occasionnellement seront indiqués au fur et à mesure.

a) Milieux de culture.

Les mycobactéries utilisées dans cette étude poussant relativement bien sur les milieux ordinaires, nous ne nous sommes servi que de trois milieux de culture, le premier liquide, le second solide et le troisième semi-solide.

1) *Milieu d'entretien des souches bactériennes.*

(Bouillon nutritif « Difco »)
8 g de produit déshydraté sont dissous dans 1 litre d'eau distillée ; le bouillon ainsi obtenu est réparti en tubes, à raison de 5 cc par tube. La plupart des souches utilisées poussant en formant un voile épais difficile à briser, on ajoute à chaque tube de bouillon une quinzaine de perles de verre d'environ 3 mm de diamètre (ces perles permettent d'obtenir une émulsion bactérienne très homogène en secouant le tube dans un agitateur électrique pendant 5 minutes). Les tubes sont enfin stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°.

2) *Gélose nutritive de base.*

(concentration en gélose : 2 %)

Mélanger les produits suivants :

Bordet Gengou agar base « Difco »	30 g
Glycérine	50 cc
Eau distillée	950 cc

Le tout est chauffé pour faire fondre la gélose, filtré sur papier pour rendre le milieu parfaitement limpide, réparti dans des ballons de 250 cc ou de 500 cc, puis stérilisé à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.
La veille de l'emploi, la gélose est fondue au bain-marie, refroidie à 50° environ, puis coulée dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre à raison de 25 cc par boîte. Quand le milieu est solidifié, les boîtes sont portées à l'étuve pendant 12 à 24 heures, ce qui permet de vérifier leur stérilité, de sécher la surface de la gélose et d'éliminer l'eau de condensation déposée sur le couvercle.

3) *Gélose molle.*

(concentration en gélose : 0,5 %)

Mélanger les produits suivants :

Bordet Gengou agar base « Difco »	7,5 g
Bouillon nutritif « Difco »	8 g
Glycérine	50 cc
Eau distillée	950 cc

Chauffer pour fondre la gélose, filtrer sur papier, répartir dans des tubes étroits à raison de 3 cc par tube, stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

b) Numération des bactériophages.

La gélose nutritive de base et la gélose molle sont utilisées pour la titration des phages, d'après la technique originale de GRATIA [31], modifiée par FROMAN et coll. [32] pour l'adapter à l'étude des mycobactériophages. Nous avons légèrement modifié la formule préconisée par Froman : en effet, la gélose molle que nous avons utilisée est à 0,5 %, alors que celle de Froman est à 0,8 %. L'emploi d'une gélose plus molle a l'avantage de donner des plages plus grandes et de permettre un étalement plus facile.

D'autre part, nous avons remplacé le produit « Bordet Gengou broth base », utilisé par Froman, mais que nous n'avons pas pu nous procurer, par un bouillon nutritif « Difco ». Les résultats sont excellents, bien que ce milieu soit un peu moins riche que celui proposé par Froman.

Rappelons brièvement le principe de la numération des phages (il serait plus correct de dire « numération des centres infectieux » ; nous reviendrons sur la distinction qu'il y a lieu de faire entre les deux expressions).

Des dilutions convenables de bactériophages sont ajoutées à des bactéries sensibles en plein développement. Le mélange est immédiatement ensemencé sur un milieu de culture adéquat (technique de d'HÉRELLE) [16]. On peut aussi ajouter ce mélange à quelques centimètres cubes de gélose molle fondue et maintenue à 50° environ, et verser le tout sur un milieu de culture solide (technique de GRATIA) [31].

Dans tous nos essais de numérations de bactériophages, nous avons fait des dilutions de 10 en 10 en mélangeant 0,5 cc de phage et 4,5 cc de diluant (bouillon nutritif « Difco »). Aux 3 cc de gélose molle fondue, et maintenue à 50° au bain-marie grâce à un thermostat, on ajoute successivement 0,3 cc d'une culture microbienne âgée de 48 heures, soigneusement agitée au préalable pour l'homogénéiser, et 0,2 cc de la dilution convenable de bactériophage. Le mélange est agité vigoureusement par rotation du tube autour de son axe (ceci évite la formation de bulles), puis versé rapidement sur la surface d'une boîte de Petri contenant le milieu de base. Quand la couche de gélose molle est solidifiée, la boîte de Petri est retournée et mise à incuber à l'étuve à 37° pendant 48 heures.

Qu'on emploie l'une ou l'autre de ces deux techniques, les bactéries, réparties uniformément sur toute la surface du milieu de culture, se développent, mais partout où un bactériophage a été ensemencé, les bactéries sont lysées, l'infection se propage aux bactéries proches, et il se forme ce que d'Hérelle a appelé une « plage claire », c'est-à-dire une zone dans laquelle toutes les bactéries sont lysées, et qui contraste avec le reste de la culture où les bactéries, ayant poussé en abondance, forment une nappe opaque.

L'avantage de la méthode de Gratia est de permettre une répartition plus homogène des bactéries et la formation de plages claires de plus grandes dimensions qu'avec la technique de d'Hérelle. Les plages, la plupart du temps bien visibles à l'œil nu, ont de 0,1 à 8 mm de diamètre chez les mycobactéries.

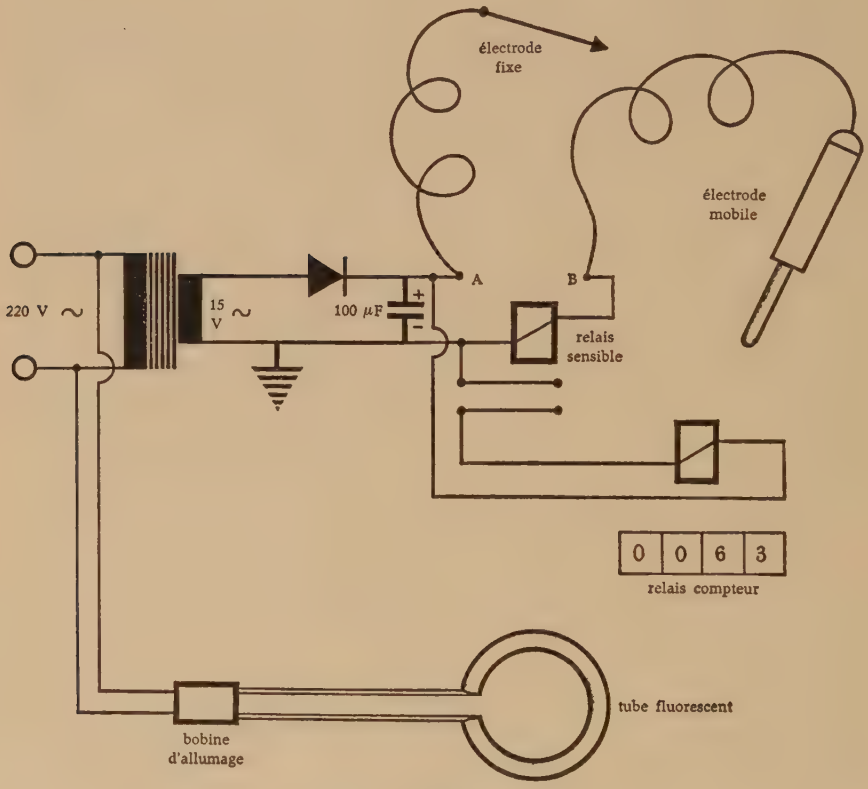
Théoriquement, chaque plage a, à l'origine, un seul phage. Si on connaît la dilution de phage employée, la quantité de dilution ensemencée et le nombre de plages apparues après culture, on pourra en déduire le titre par un simple calcul. Or si, dans la pratique, une plage n'a en effet qu'un seul phage à l'origine (à condition que le nombre de bactéries ensemencées soit très grand par rapport au nombre de phages ajoutés), il s'en faut de beaucoup que chaque phage ensemencé provoque la formation d'une plage visible. Nous reparlerons plus loin de ce problème.

L'étude détaillée des propriétés d'un bactériophage demande un très grand nombre de titrations, dont les résultats, convenablement interprétés, donnent toujours une quantité de renseignements sur le système phage-hôte.

Suivant le diamètre des plages, on peut en obtenir de 100 à plus de 10'000 par boîte de Petri, sans qu'elles soient confluentes. Il est évident qu'il y a intérêt à employer une dilution de phages telle qu'un grand nombre de plages se forment, ce qui diminue l'erreur relative du résultat.

Il convient donc d'avoir un moyen commode pour compter les plages, moyen qui permette de compter toutes les plages, de ne les compter qu'une fois chacune, et enfin de pouvoir s'arrêter de compter à n'importe quel moment sans risque d'erreur.

En nous inspirant d'appareils destinés à cet usage, nous avons construit, à partir d'un matériel très simple, un petit appareil qui répond à ces exigences. Le schéma en est donné à la fig. 1.



(Fig. 1)

Appareil à compter les plages.

Le courant alternatif du secteur sert à alimenter, par l'intermédiaire d'une bobine d'allumage, un tube fluorescent circulaire, placé lui-même à 5 cm environ au-dessous d'une ouverture ronde pratiquée dans le couvercle de la boîte qui contient l'ensemble. Cette ouverture, fermée par une plaque de verre, est du même diamètre que les boîtes de Petri. A l'intérieur du cercle formé par le tube fluorescent se trouve un carton noir.

Quand une boîte de Petri avec des plages est placée sur l'appareil allumé, les bactéries sont fortement illuminées, tandis que les plages restent sombres.

D'autre part, le secondaire d'un transformateur alimenté par le secteur délivre une tension alternative de 15 V ; le courant est redressé par une diode au sélénium, puis filtré sommairement par un condensateur électrolytique de 100 μF.

Un relais sensible est alimenté par le courant continu ainsi obtenu. Le circuit est interrompu aux points A et B. Au point A est connectée une électrode fixe qui, au moment de l'emploi, est plantée dans la gélose, sur le bord de la boîte dont on désire compter les plages. Au point B est connectée une électrode mobile (pointe de touche). Au moyen de cette pointe de touche, on pique successivement toutes les plages de la plaque. Le courant passe à travers la gélose, et la palette mobile du relais sensible est attirée, fermant ainsi le circuit d'un relais compteur, alimenté également en courant continu. Ce relais, d'une résistance interne de 350 ohms, avance d'une unité chaque fois qu'une plage est piquée avec l'électrode mobile. La fréquence de comptage peut être très grande. Chaque plage déjà comptée est aisément reconnaissable grâce à la trace laissée dans la gélose par la pointe de touche.

c) Préparation des stocks de bactériophage.

On ensemence dans un ballon contenant 200 cc de bouillon nutritif « Difco » 5 cc d'une culture homogène âgée de 48 heures de bactéries sensibles et 5 cc de bactériophage ayant un titre d'environ 10^6/cc.

Au moyen d'une petite soufflerie électrique, et par l'intermédiaire d'une pipette effilée, on fait arriver de l'air dans le fond du ballon, à raison d'une dizaine de bulles par seconde. La pipette contient suffisamment d'ouate stérile pour filtrer l'air envoyé par la soufflerie. Nous n'avons jamais observé de contamination due à des germes de l'air.

Cette aération a la double fonction d'apporter de l'oxygène nécessaire à la culture, et d'agiter continuellement le milieu. Le rendement est alors très satisfaisant. Le tout est maintenu à 37°.

Après un séjour de 48 heures à l'étuve, la culture est filtrée sur une bougie Chamberland L3 ; le filtrat est réparti dans des ampoules de 10 cc, les ampoules sont scellées et conservées à la glacière à 4°.

Chaque nouveau stock de bactériophage est contrôlé pour vérifier si la filtration a été correcte. Enfin, le titre du phage est déterminé par la méthode indiquée plus haut.

Recherche de mycobactériophages

Gardner et Weiser [18] qui, les premiers, ont isolé un bactériophage actif sur les mycobactéries, pensaient que si aucun isolement d'un tel bactériophage n'avait été signalé avant eux, cela était dû à la distribution très limitée de ces organismes.

Le grand nombre de travaux publiés plus tard sur l'isolement de mycobactériophages pourrait sembler leur donner tort. A notre avis, ce n'est pas le cas. Il semble en effet que partout où de tels phages existent, leur isolement, par une technique ou par une autre, est relativement facile. Dans de tels endroits, il est chose courante d'isoler plusieurs souches différentes. Par contre, dans d'autres, les essais répétés ne servent à rien, et la technique employée n'est probablement pas en cause.

Comme pour l'isolement d'autres bactériophages, il est naturel de faire les tentatives d'isolement dans des endroits où les germes sensibles sont abondants. Les mycobactéries se trouvent assez fréquemment dans la terre et dans les eaux, en particulier lorsque ces eaux sont en contact avec des matières fécales humaines ou animales.

Mais il faut bien se garder de conclure qu'il y a des mycobactériophages partout où il y a des mycobactéries. Les échecs fréquents de différents auteurs sont là pour l'affirmer.

Nous allons examiner les deux techniques les plus employées pour les isolements des mycobactériophages, et qui semblent avoir donné d'excellents résultats.

La technique dite « d'enrichissement » est due à Bottcher et Hofer [33], qui l'ont utilisée avec succès pour l'isolement de bactériophages actifs sur les bactéries des légumineuses. Cette technique, légèrement modifiée, a été reprise par Gardner et Weiser [18] :

200 g environ de terre sont additionnés d'une petite quantité de $CaCO_3$. L'échantillon est porté à l'étuve à 37° pendant huit mois et, deux fois par semaine, on ajoute à la terre 5 à 10 cc d'une suspension riche préparée avec une culture jeune de *Mycobacterium smegmatis* (suspension faite à partir d'une culture en bouillon glycériné âgée d'une semaine, triturée dans un mortier et lavée deux fois avec de l'eau physiologique).

La recherche de bactériophage dans le mélange se fait par la méthode des plages, en utilisant diverses souches de *Mycob. smegmatis* comme bactéries « sensibles ».

Dans le travail de Gardner et Weiser, les premiers essais de recherche n'ont été entrepris qu'à partir du troisième mois. Le bactériophage a pu être mis en évidence dès ce moment-là.

Dans une deuxième expérience, les auteurs ont fait la recherche de phage dès le début, et d'une façon régulière. Le phage ne s'est révélé qu'après la troisième semaine d'enrichissement et, chose importante, aucun bactériophage n'a pu être mis en évidence dans des essais témoins faits avec la même terre, mais sans enrichissement. Il y aura lieu de revenir sur cette constatation.

Une deuxième méthode d'isolement, employée par Hauduroy et Rosset [19], et utilisée par la suite avec succès par d'autres auteurs, en particulier

par VANDRA et GAL [29], permet d'isoler les phages sans l'intervention d'autres mycobactéries que celles que la terre contient déjà. Cette méthode a encore l'avantage d'être considérablement plus rapide que la technique d'enrichissement.

Une certaine quantité de terre est ensemencée dans du bouillon, qu'on porte à l'étuve à 37° pendant 48 heures. La culture est alors filtrée sur une bougie Chamberland L3 et la recherche se fait en milieu liquide, en présence de diverses souches de mycobactéries.

Quand la présence de bactériophage est confirmée par une différence d'intensité entre la culture témoin et celle à laquelle une certaine quantité de filtrat a été ajoutée, il convient d'exalter le pouvoir lytique du phage par plusieurs passages en série sur une souche sensible.

Nous avons donc à notre disposition deux méthodes excellentes pour les isolements. Est-ce à dire que l'une et l'autre sont parfaites ?

Certainement pas. Nous devons nous poser un certain nombre de questions à propos de la valeur de ces deux techniques présentant chacune des avantages et des inconvénients qu'il convient de relever.

Pourquoi, par exemple, Gardner et Weiser ont-ils trouvé du phage dans la terre enrichie avec des mycobactéries et pas dans la même terre non enrichie ? La même observation a été faite par HNAKTO [23] et par MCLAREN [24]. Cette question pose en même temps celle de l'origine des phages isolés de la terre.

Partons tout d'abord du principe que le bactériophage isolé par ces auteurs se trouvait effectivement dans la terre. S'il s'y était trouvé en grande quantité, il aurait été sans doute facile de l'isoler rapidement et sans faire d'enrichissement.

Il est donc probable que le phage s'y trouvait en petite quantité. Le fait de mettre la terre à l'étuve permet sans doute aux phages de se multiplier dans une certaine mesure, à condition que la terre contienne à l'origine des mycobactéries sensibles elles-mêmes en train de se développer. La multiplication des phages doit être lente dans ces conditions, probablement à cause de la composition du milieu, qui n'est pas très favorable, et aussi parce que, lorsque les concentrations en bactéries sensibles et en bactériophages sont faibles, la probabilité que des phages se fixent sur des bactéries sensibles est très petite, et, par conséquent, les chances de multiplication également.

On sait d'autre part que les phages peuvent se fixer sur des bactéries sans les lyser ; ces phages sont alors perdus pour l'isolement. Enfin, lors de la filtration, il y a une adsorption des phages qui est loin d'être négligeable ; en effet, comme nous le montrerons par la suite, certains filtres retiennent jusqu'à 100 % des phages.

La technique d'enrichissement permet d'augmenter considérablement les chances de fixation et, avec les doses massives de bactéries que les auteurs recommandent d'ajouter, on doit pratiquement obtenir que tous les phages présents dans l'échantillon se fixent sur les mycobactéries.

La technique employée par Hauduroy et Rosset atteint le même résultat par un autre moyen. Dans le bouillon, les mycobactéries se multi-

plient rapidement (la plupart des mycobactéries saprophytes y poussent abondamment en 48 heures) et, dans ce cas comme dans le précédent, il est probable que tous les phages présents pourront se fixer sur les bactéries sensibles.

Encore faut-il que la terre contienne des mycobactéries sensibles. Dans la technique d'enrichissement, l'apport de souches généralement différentes dans leur comportement vis-à-vis des phages augmente les chances que le phage trouve une souche bactérienne favorable à son développement. Enfin, dans le cas où plusieurs phages différents se trouvent dans le même échantillon de terre, l'apport d'une seule souche déterminée permet de sélectionner l'un des phages en présence en favorisant sa croissance au détriment de celle de l'autre ; mais il est plus avantageux d'ajouter un mélange de mycobactéries, la séparation des phages pouvant être faite plus tard sans difficultés.

Nous étions partis du principe que le phage isolé de la terre par Gardner et Weiser et, plus tard, par d'autres auteurs, se trouvait au départ dans la terre. Mais nous devons aussi nous demander si les bactériophages isolés par la méthode d'enrichissement ne sont pas apportés par les bactéries servant à l'enrichissement.

Cette question mérite d'autant plus d'être examinée que des souches lysogènes de mycobactéries ont été décrites récemment [**34**] [**35**] [**36**]. On sait en effet que les souches lysogènes transportent toujours avec elles une petite quantité de phage libre [**37**]. Penso [**38**], dans une communication personnelle à Hnakto, signale que la souche « Lausanne 7 » est accompagnée de phage « Pellegrino ». Il est donc possible que certains bactériophages que l'on croit isolés du sol soient en fait apportés par les souches servant à enrichir les cultures de terre. Ce n'est évidemment pas toujours le cas. L'essai parallèle avec une terre stérilisée permet de déterminer le rôle exact des souches servant à l'enrichissement.

L'expérience a été faite en particulier par McLaren [**24**] qui, à partir de trois échantillons de la même terre, a essayé d'isoler un phage 1°) sans enrichissement ; 2°) avec l'adjonction d'une souche de *Mycob. smegmatis* et 3°) avec l'adjonction de cette même souche à l'échantillon de terre stérilisé au préalable. L'auteur n'a pu isoler le phage que dans le second cas.

On peut en conclure que, dans cette expérience, le phage n'est pas apporté par la souche de *Mycob. smegmatis,* et qu'il se trouve probablement en trop petite quantité pour être isolé de la terre sans enrichissement.

Notons pour terminer que l'origine du phage n'est pas pour autant éclaircie ; il est possible que le phage isolé provienne tout-de-même d'une souche lysogène, présente dans le sol, ce qui expliquerait du reste sa très faible concentration. Un travail récent signale précisément l'isolement d'une souche de mycobactéries lysogènes à partir de la terre [**36**].

ESSAIS PERSONNELS

Nous avons cherché tout d'abord des mycobactériophages dans la terre, dans des expectorations, dans des selles, dans des excréments de cobayes et de hamsters, dans du fumier, dans des eaux de lac et dans des eaux usées.

A. Recherche dans la terre.

Nos essais ont porté sur 6 terres d'origines diverses, dont 3 étaient engraissées avec du fumier. Chaque sorte de terre a donné lieu à 4 essais parallèles :

1. Technique de Hauduroy et Rosset [**19**] à 20°
2. Technique de Hauduroy et Rosset à 37°
3. Technique de Gardner et Weiser modifiée par Froman [**32**] à 20°
4. Technique de Gardner et Weiser modifiée par Froman à 37°.

Dans ces deux derniers cas, les enrichissements ont été faits avec un mélange de souches provenant du C. I. C. C. de Lausanne (*) : *Mycob. smegmatis* 169, *Mycob. smegmatis* 909 et *Mycob. friburgensis* 908.

Après le temps nécessaire au développement, chaque culture a été centrifugée pour éliminer soit les parcelles de terre, soit les bactéries, puis filtrée à travers une bougie Chamberland L3 qui, comme nous le signalerons dans une autre partie de ce travail, est beaucoup plus favorable au passage des phages que d'autres filtres.

La recherche du phage se fait dans le filtrat en milieu solide et en milieu liquide :

a) *Milieu liquide.*

1 cc du filtrat est ajouté à 5 cc de bouillon ensemencé avec une des souches employées pour l'enrichissement. Le tout est porté à l'étuve à 37° jusqu'à ce qu'un témoin sans filtrat ait poussé abondamment. On compare alors les deux tubes. Une différence d'intensité entre les deux cultures indique l'existence dans le filtrat d'un phage ou d'une substance bactériostatique. Si une telle différence est notée, il y a lieu de procéder à d'autres essais pour déterminer la nature de ce qui a empêché la culture dans l'un des tubes.

b) *Milieu solide.*

On ajoute à 3 cc de gélose molle fondue à 50° 0,3 cc d'une culture de l'une des souches employées pour l'enrichissement ; le mélange est étalé rapidement dans une boîte de Petri contenant 25 cc de gélose Bordet-Gengou solidifiée. Après refroidissement, on dépose une goutte de chaque filtrat à la surface de la boîte, qui est laissée pendant 24 heures à la température du laboratoire pour permettre à la gélose molle d'absorber le liquide ; la boîte est ensuite mise à l'étuve à 37° pendant 48 heures, après quoi la lecture peut être faite.

Une tache lytique indique la présence d'un phage ou d'une substance bactériostatique. D'autres essais permettent éventuellement de déterminer la nature du principe contenu dans le filtrat.

Résultats : Dans aucune des six terres examinées, et par aucune des méthodes employées, la présence de mycobactériophage n'a pu être mise en évidence.

(*) C. I. C. C. : Centre International de Collections de Cultures, 19, rue César Roux, Lausanne. Directeur : Prof. Paul Hauduroy.

B. **Recherche dans des expectorations.**

Des expectorations provenant de tuberculeux et contenant des bacilles acido-alcoolo-résistants ont été réunies par cinq (20 à 50 cc au total), puis ensemencées en quantités égales dans deux ballons contenant chacun 200 cc de bouillon. L'un des ballons a été mis pendant 48 heures à l'étuve à 37°, puis son contenu a été centrifugé et filtré sur bougie Chamberland L3. L'autre ballon a reçu des enrichissements composés des mêmes souches que celles qui ont été employées pour les terres. A la fin des enrichissements, les cultures ont été centrifugées et filtrées.

Au total, 25 expectorations ont été examinées par les deux méthodes.

Résultats : La présence d'aucun mycobactériophage n'a pu être démontrée au cours de ces essais, tant en milieu liquide qu'en milieu solide.

C. **Recherche dans des selles humaines.**

Quelques grammes de matières fécales sont ajoutés à 200 cc de bouillon. Les essais ont été faits également à double, comme pour les expectorations : technique de Hauduroy et Rosset, et technique d'enrichissements, avec les souches 169, 909 et 908. Les cultures ont été ensuite centrifugées et filtrées.

Au total, 6 selles ont été examinées par les deux méthodes.

Résultats : La présence d'aucun mycobactériophage n'a pu être démontrée au cours de ces essais, tant en milieu liquide qu'en milieu solide.

D. **Recherche dans des excréments de cobayes et de hamsters.**

En employant la même technique que pour les selles humaines, nous avons cherché la présence de mycophages dans des excréments de cobayes (10 animaux) et de hamsters (20 animaux), inoculés les uns et les autres avec des mycobactéries (bacilles tuberculeux authentiques ou mycobactéries atypiques).

Résultats : Les filtrats des cultures d'excréments de cobayes, essayés en milieu liquide avec les souches 521, 690, 908, 909 et 1114 (souches du C. I. C. C. connues comme sensibles à plusieurs mycobactériophages), ont montré au premier passage de très légères différences avec les témoins, mais plus aucune différence n'a pu être notée au deuxième passage, pas plus qu'aux suivants.

Le principe ayant entravé les cultures au premier passage n'est donc pas un bactériophage.

Dans le cas des excréments de hamsters, les essais ont été négatifs dès le début.

Enfin, tous les essais faits en milieu solide ont été également négatifs dès le début.

E. **Recherche dans du fumier.**

La recherche de mycobactériophage a été faite dans trois échantillons de fumier, en employant la même technique que pour la recherche dans les selles.

Résultats : La présence d'aucun mycobactériophage n'a pu être démontrée au cours de ces essais, tant en milieu liquide qu'en milieu solide.

F. **Recherche dans des eaux de diverses provenances.**

Lors des essais effectués avec des eaux, nous avons employé exclusi-

vement des cultures sans enrichissements, faites de la façon suivante :

On prépare un bouillon nutritif « Difco » concentré :

Bouillon nutritif « Difco »	16 g
Eau distillée	1000 cc

Le tout est agité pour dissoudre la poudre, et le bouillon ainsi obtenu est réparti dans des ballons de 100 cc à raison de 50 cc par ballon. On stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°.

On ajoute ensuite au contenu d'un ballon 50 cc de l'eau à examiner, ce qui ramène la concentration du bouillon à celle qui est indiquée par le fabricant. Les ballons sont mis à l'étuve à 37° pendant 48 heures. Au bout de ce laps de temps, les cultures, souvent très abondantes, sont centrifugées longuement, puis filtrées sur bougies Chamberland L3.

En outre, une partie de chaque échantillon d'eau a été filtrée dès le début, afin de chercher le phage sans aucune culture.

La recherche de phage dans les filtrats des eaux et dans les filtrats des cultures a été faite en milieu liquide et en milieu solide, selon la technique qui a déjà été décrite, et en employant les souches de mycobactéries suivantes : 55/b, 214, 521, 690, 804, 900, 908, 909 et 1114 (les détails concernant ces souches seront donnés au chapitre suivant).

Au total, 20 eaux ont été examinées : 6 eaux provenant du Lac Léman, 2 eaux industrielles, 6 eaux provenant du collecteur principal de la station d'épuration des eaux usées d'Yverdon, 5 eaux du Lac de Bret et l'eau des égouts de la Clinique Sylvana (malades tuberculeux).

Résultats : La présence d'aucun mycobactériophage n'a pu être démontrée au cours de ces 20 essais, tant en milieu liquide qu'en milieu solide.

Lors des essais faits avec l'eau des égouts de la Clinique Sylvana, après culture et filtration, une légère différence d'intensité de la culture avait été notée entre le témoin et le tube ensemencé avec le filtrat, pour les souches 521, 690 et 909, tandis qu'aucune différence n'était notée pour les tubes ensemencés avec les autres souches.

Après filtration des tubes présentant des différences avec le témoin, des essais ont été faits avec les souches 521, 690 et 909 et les nouveaux filtrats ; plus aucune différence n'a pu être notée entre les témoins et les tubes contenant les filtrats.

La répétition de ces essais a confirmé que les différences observées au début devaient être attribuées à autre chose qu'à un bactériophage, puisque les passages en série diminuaient le pouvoir lytique au lieu de l'exalter, comme c'est précisément le cas pour les bactériophages.

Le phénomène d'inhibition observé dans ces quelques exemples est dû peut-être à un facteur analogue aux bactériocines, dont la présence a été démontrée chez un certain nombre de mycobactéries par Chavez-Mora [**39**], mais il est également possible que ce phénomène soit provoqué par une substance bactériostatique ou bactéricide banale contenue dans l'eau d'égouts.

Discussion.

Au total, la recherche de bactériophages anti-mycobactéries a porté sur 90 échantillons de matériel de diverses provenances, et les nombreux essais effectués sur chacun d'eux ont tous été négatifs. Nous sommes loin des 100 % de succès obtenus par Takeya et Yoshimura [**28**] dans leurs

essais à partir du sol, et des nombreux isolements faits par divers auteurs.

Les techniques que nous avons employées ne sont certainement pas en cause, puisque l'une et l'autre ont donné dans d'autres cas d'excellents résultats. Il est donc des plus probables que les échantillons que nous avons examinés ne contenaient pas de mycobactériophages.

Ainsi, l'hypothèse de GARDNER et WEISER [**18**], déjà citée, et selon laquelle la distribution géographique de tels bactériophages est très limitée, se trouverait confirmée. La composition du sol joue certainement un rôle mais, à notre connaissance, aucune étude comparée n'a été faite sur la composition des terres contenant des mycophages et de celles qui n'en contiennent pas. L'hypothèse intéressante de VARRIER-JONES [**17**] sur le rôle du zinc dans la présence des mycobactériophages n'a malheureusement pas été confirmée.

Par contre, une constatation faite à plusieurs reprises en particulier par des auteurs japonais [**28**] [**40**], selon laquelle l'isolement des mycobactériophages est beaucoup plus fréquent à partir des terres engraissées par des excréments humains ou animaux qu'à partir des terres non engraissées, doit retenir l'attention.

On peut supposer soit que les phages sont apportés par les excréments, soit que ces excréments contiennent un « facteur de croissance » pour les bactéries ou les bactériophages. A notre connaissance, ce dernier point n'a pas encore été éclairci.

Pour ce qui est de la première hypothèse, nous avons tenté de la vérifier en essayant l'isolement de mycophages à partir de selles humaines et d'excréments de cobayes et de hamsters. On sait que les selles contiennent très fréquemment des bactériophages lysant les entérobactériacées. D'autre part, la présence de mycobactéries dans le tractus gastro-intestinal n'est pas une exception ; en effet, outre les bacilles tuberculeux qu'on trouve parfois dans les liquides de lavage gastrique, on a souvent isolé de ce même matériel des mycobactéries non pathogènes. La présence de mycophages dans les selles est donc possible ; elle a du reste déjà été signalée [**26**] [**30**]. Mais, comme nous l'avons dit plus haut, nos essais ont été négatifs. De même, la recherche de mycophages dans les excréments de cobayes et de hamsters a été négative.

HNAKTO, en 1953 [**34**], a, lui aussi, échoué dans ses tentatives d'isolement de mycophages à partir d'expectorations et de selles.

Il faut encore émettre une hypothèse sur l'influence des selles sur la fréquence des isolements de mycobactériophages à partir de la terre. Les selles, nous l'avons dit, contiennent parfois des mycobactéries ; l'apport de ces mycobactéries constitue en quelque sorte un enrichissement, qui peut avoir la même influence sur le développement des phages très rares que les enrichissements faits au cours de l'expérimentation.

Une dernière hypothèse pourrait expliquer l'échec de nos essais d'isolement : il est possible que les échantillons examinés contenaient (si ce n'est tous, du moins certains d'entre eux) un mycophage, peut-être même en grande quantité, mais s'attaquant à d'autres mycobactéries que celles qui ont été utilisées pour l'essai des filtrats. Cette explication n'est pro-

bablement pas la bonne, car, parmi les souches employées, il y avait la souche 521 et la souche 909, qui sont sensibles à la plupart des mycobactériophages connus.

G. Recherche dans des larves de Culex pipiens.

Une série d'autres essais, faits du reste avant ceux dont nous venons de donner le détail, a donné un résultat positif. La raison du choix du matériel utilisé pour l'isolement nécessite quelques mots d'explication.

A plusieurs reprises, le Dr Gaschen, alors chef des travaux à l'Institut de Bactériologie, de Parasitologie et d'Hygiène de Lausanne, avait attiré notre attention sur la présence fréquente, chez certaines larves de moustiques, de bacilles acido-alcoolo-résistants. L'observation peut être faite très facilement de la façon suivante :

Une larve est écrasée entre lame et lamelle, le frottis est étalé sur toute la surface de la lame, puis séché et fixé à la chaleur, et enfin coloré par la méthode de Ziehl.

Si on désire une préparation plus propre et moins épaisse, on doit faire un frottis du tube digestif et de son contenu, en opérant de préférence sous une loupe binoculaire. La larve est posée sur une lame, puis, au moyen d'une aiguille montée, on tient fermement sa tête. Avec une autre aiguille, on tire sur l'extrémité postérieure du corps de la larve. On arrive ainsi, avec un peu d'habitude, à enlever tout le corps de la larve ; il ne reste alors sur la lame que la tête et le tube digestif, qu'il est facile ensuite de prélever et d'étaler sur une autre lame, qui sera séchée, fixée et colorée par la méthode de Ziehl.

L'examen microscopique montre alors les bacilles acido-alcoolo-résistants, qui sont parfois si abondants qu'on dirait une culture pure.

Partant de l'idée, déjà admise, que les mycobactériophages se trouvent plus facilement dans les endroits riches en mycobactéries que dans les autres, nous avons pensé à tenter l'isolement à partir des larves de moustiques. Tous nos essais ont porté sur des larves de *Culex pipiens* mises aimablement à notre disposition par le Dr Gaschen.

Cette recherche a du reste été encouragée par la description faite par certains auteurs de l'évolution de la flore intestinale, en particulier des colibacilles, chez les larves de ces insectes.

Violle et Sautet [**41**] signalent en 1937 que, si les larves de *Culex pipiens* renferment une grande quantité de colibacilles, les adultes, eux, n'en ont pas. L'origine des colibacilles chez les larves s'explique aisément : la plupart d'entre elles vivent dans des fosses septiques qui contiennent ces germes en abondance. Il semble donc que les moustiques se stérilisent dès l'éclosion de l'insecte parfait.

En 1938, les mêmes auteurs [**42**] mettent en évidence chez les *Culex* un principe bactéricide formé de deux éléments, l'un thermostable, présent chez l'adulte, l'autre thermolabile, se trouvant chez la nymphe. Aucun des deux ne se trouve chez la larve.

En 1951, enfin, Ranque [**43**] reprend le problème sous un autre angle et montre que le pouvoir bactéricide existe plus volontiers chez les *Culex pipiens* de variété autogène que chez les moustiques d'autres provenances.

Des observations analogues peuvent être faites à propos des mycobactéries. Au sein d'une population de larves de moustiques, la présence

de bacilles acido-alcoolo-résistants chez un individu signifie à coup sûr leur présence chez tous les autres individus. Cette constatation, faite à plusieurs reprises, permet l'expérience suivante : une vingtaine de larves jeunes, prises dans une population où la présence de mycobactéries a été démontrée, sont conservées dans de l'eau de mare ; au fur et à mesure de leur développement, on fait la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants dans une larve qu'on sacrifie.

Chez les larves de premier stade, les bacilles sont rares. Chez celles de deuxième et de troisième stade, le tube digestif contient de très nombreux bacilles, mais, brusquement, au début de la nymphose, les bacilles acido-alcoolo-résistants disparaissent complètement.

Nous avons pensé à la possibilité de l'intervention d'un bactériophage, qui aurait pu éventuellement se confondre avec le « principe bactéricide thermolabile » de Violle et Sautet. Pourquoi ce bactériophage n'interviendrait-il qu'à la fin du stade larvaire ? C'est une question à laquelle il est difficile de répondre ; nous reparlerons de ce problème après la description de nos essais d'isolement.

Technique de recherche dans les larves.

Une larve de *Culex pipiens*, prélevée dans une population où la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants a été reconnue, est lavée deux fois dans de l'eau distillée stérile, puis est plongée dans une solution de formol à 5 % pendant 15 minutes. Deux nouveaux lavages à l'eau distillée stérile permettent d'éliminer le formol. Puis le tube digestif de la larve est prélevé de la façon déjà décrite. Ce tube digestif est ensemencé dans un tube de bouillon, qui est porté à l'étuve pendant 48 heures à 37°. Au bout de ce laps de temps, la culture, très abondante et formée presque exclusivement de bacilles gram négatifs, est centrifugée puis filtrée sur une bougie Chamberland L3, mouillée au préalable avec 5 cc de bouillon. Le filtrat est ensuite essayé avec diverses mycobactéries saprophytes, soit en milieu liquide, soit en milieu solide.

Nos essais ont porté sur des larves de *Culex pipiens* de diverses provenances et à différents stades.

Origine des larves : Cossonay, Lausanne, Pully, Chesières (canton de Vaud) et Sorengo (canton du Tessin).

Dans tous les cas, les essais ont été faits à partir de larves des premier, deuxième et troisième stades. Nous avons aussi fait quelques essais d'isolement à partir de nymphes.

Résultats : Les essais ont été tous négatifs, sauf un. Il a été en effet possible d'isoler un mycobactériophage à partir d'une larve provenant de Cossonay, et nous avons donné à ce phage le nom de l'endroit de sa provenance.

Au premier essai avec la souche 909, la culture avec adjonction de filtrat était très légèrement plus faible que le témoin. Cette culture a été filtrée, puis le filtrat a été mis en présence de la souche 909. La différence avec le témoin était déjà plus visible que lors du premier essai. Après cinq nouveaux passages, faits toutes les 48 heures en présence de la souche 909, nous avons obtenu un bactériophage lysant parfaitement cette souche 909 en milieu liquide.

Dans quelques autres essais d'isolement (larves de Lausanne et de Chesières), une certaine différence d'intensité entre la culture avec filtrat et le témoin avait été notée, mais le phénomène ne s'est plus manifesté lors des repiquages suivants, ce qui indique qu'il devait s'agir d'une substance bactéricide ou bactériostatique banale et non d'un bactériophage.

D'autre part, afin de nous assurer que le bactériophage isolé d'une larve de Cossonay ne provenait pas de l'eau environnante, mais qu'elle provenait bien de la larve, nous avons fait un essai d'isolement à partir de l'eau dans laquelle cette larve avait été prélevée. Le résultat a été négatif, c'est-à-dire qu'aucun bactériophage n'a pu être isolé de l'eau où vivaient des larves elles-mêmes porteuses de mycobactériophages.

En marge de ces recherches, nous avons encore essayé, toujours à partir de larves de Cossonay, d'isoler un bactériophage actif sur des colibacilles, germes présents en grand nombre dans le tube digestif de ces larves. Nous avons employé la même technique que pour l'isolement des mycophages. Le filtrat a été essayé sur 5 souches différentes de colibacilles, mais aucun phage actif sur ces germes n'a pu être isolé.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'isoler les mycobactéries contenues dans le tube digestif de ces larves, pour étudier leur sensibilité au bactériophage isolé. Le Dr Gaschen en avait déjà isolé une souche à partir de larves de *Culex pipiens* d'une autre provenance. Cette souche est conservée au C. I. C. C., où elle porte le numéro 75. D'autre part, de nombreuses souches de mycobactéries ont été isolées d'autres insectes, en particulier de mouches domestiques ; plusieurs de ces souches se trouvent au C. I. C. C.

Si l'isolement est, d'une façon générale, relativement facile, nous n'avons cependant pas réussi à le faire, malgré des essais répétés, à partir des larves porteuses de bactériophage.

Voici une méthode qui donne de bons résultats pour des souches présentes chez d'autres larves.

Le tube digestif, prélevé comme il a été dit plus haut, est ensemencé dans 50 cc de milieu d'ASHBY :

Phosphate bipotassique	0,2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Carbonate de calcium	5,0 g
Chlorure de sodium	0,2 g
Glycérine	50 cc
Eau distillée	1000 cc

Les ingrédients sont dissous, puis le milieu est réparti à raison de 50 cc par ballon dans des ballons de 100 cc (de façon à avoir une grande surface de contact avec l'air). On stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°.

L'incubation se fait à la température du laboratoire. Il faut attendre une quinzaine de jours pour voir apparaître un voile très mince à la surface du milieu. On vérifie la présence dans ce voile de bacilles acido-alcoolo-résistants.

Pour les isoler des autres germes qui se sont développés en même temps, on ensemence une partie du voile dans le milieu de SÖHNGEN :

Phosphate bipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Chlorure d'ammonium	0,5 g
Carbonate de sodium	traces
Eau distillée	1000 cc

Après dissolution des sels, le milieu est réparti dans des Erlenmeyer de 200 cc (50 cc de milieu par Erlenmeyer). On stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°, puis, après refroidissement, on fait tomber dans le milieu de culture quelques gouttes de paraffine fondue et stérile. La paraffine se solidifie.

On porte le milieu ensemencé à l'étuve et, après quelques jours, des colonies de bacilles acido-alcoolo-résistants, souvent pigmentées, apparaissent autour des gouttes de paraffine. On achève de purifier la souche par des passages répétés sur le milieu de Löwenstein.

Nous avons pu, par ce moyen, isoler des souches de mycobactéries à partir de larves de *Culex pipiens,* mais il nous a été impossible de le faire à partir de celles qui provenaient de Cossonay. Nous avons répété les essais, mais sans obtenir de résultats positifs.

Pensant que la présence du bactériophage pouvait être la cause de cet insuccès, nous avons essayé un milieu de culture dans lequel les mycobactériophages ne peuvent pas exercer leur pouvoir lytique : le milieu de DUBOS [**44**]. On sait en effet [**45**] [**46**] que le Tween 80 présent dans ce milieu empêche la fixation du phage sur la bactérie, et par là sa reproduction.

Or, malgré l'emploi de ce milieu, nous n'avons pas réussi à isoler les mycobactéries qui (les examens microscopiques l'avaient prouvé) se trouvaient en abondance dans le tube digestif de la larve.

Discussion.

La présence de mycobactériophage dans le tube digestif de larves de moustiques peut s'expliquer de deux façons.

On peut d'abord supposer que le phage provient de l'eau dans laquelle les larves ont été prises. L'impossibilité d'isoler le phage à partir de cette eau pourrait être due à la très grande dilution. Le tube digestif des larves, riche en mycobactéries, est alors un milieu très favorable au développement des bactériophages, et, dans un tel milieu, la concentration en phages peut rapidement atteindre une valeur suffisante pour permettre l'isolement. La probabilité qu'une larve absorbe un phage est évidemment très petite, mais le fait que l'isolement à partir d'une larve n'ait réussi que dans un seul cas ne peut que confirmer cette supposition.

Il y aurait là du reste une façon très élégante d'isoler, à partir de l'eau, des bactériophages trop dilués pour pouvoir être isolés directement. Il faudrait, bien entendu, être sûr que les larves soient porteuses de mycobactéries sensibles. On pourrait aussi, dans ce but, inoculer des larves non porteuses avec une souche connue comme très sensible. A notre connaissance, de telles expériences n'ont jamais été faites ; comme

ce sujet, si intéressant qu'il soit, sortait du cadre de notre étude, nous ne l'avons pas approfondi.

Si, comme nous le supposons maintenant, les phages provenaient de l'eau, comment pouvons-nous expliquer la présence simultanée, dans le tube digestif des larves, de bactéries et de bactériophages ? Comme il nous a malheureusement été impossible d'isoler les mycobactéries, il est difficile de donner la bonne explication ; mais il est cependant possible de formuler quelques hypothèses.

On peut admettre que les mycobactéries vues au microscope sont des individus résistants. On sait en effet que des bactéries sensibles peuvent devenir spontanément résistantes après avoir été en contact avec un bactériophage.

Mais il est aussi possible que les larves soient porteuses de deux souches différentes de mycobactéries, l'une résistante, l'autre sensible à l'action du bactériophage.

Enfin, nous avons observé *in vitro* un phénomène qui pourrait aussi se passer *in vivo*, et qui expliquerait la présence simultanée de bactéries et de bactériophage. Ce phénomène est mis en évidence par l'expérience suivante :

On ensemence dans un tube de bouillon une certaine quantité de mycobactéries et un bactériophage capable de les lyser. On place le tube à l'étuve pendant 48 heures. Rien ne pousse, alors qu'un témoin sans phage montre une culture abondante. La preuve est faite que la souche est sensible et ne contient au début aucun élément résistant.

Si on répète l'essai, mais en gardant le tube à la température du laboratoire, ou mieux, à 15°, ou encore à la glacière à 4°, le résultat sera tout autre. La croissance des mycobactéries est d'autant plus lente que la température est plus basse, mais elle a lieu. Cette croissance est pourtant ralentie dans une moindre mesure que le processus de la lyse, qui peut être même totalement interrompue : fixation du phage, temps de latence, lyse proprement dite. Le bactériophage est, pour ainsi dire, pris de vitesse, et la culture progressant à un rythme plus rapide que la lyse, une culture va apparaître, culture très faible, mais cependant visible à l'œil nu. Cette culture, au contraire des cultures secondaires, sera formée de bactéries sensibles. Pour s'en assurer, il suffit de mettre le tube à l'étuve, et, en 48 heures, les bactéries qui avaient pu pousser à basse température seront lysées.

L'eau dans laquelle vivent les larves étant à une température relativement basse, il est possible que ce phénomène explique la présence simultanée de bactéries et de bactériophages, et aussi l'impossibilité d'isoler la souche de mycobactéries, puisque les essais d'isolement ont été faits à 37°. Il aurait alors été possible de réussir l'isolement en opérant à une température plus basse, mais au moment où nous avons tenté l'isolement, nous n'avions pas encore observé ce phénomène, et nous n'avons pas essayé une telle culture.

Cependant, la présence simultanée de bactéries et de bactériophages dans le tube digestif des larves peut encore s'expliquer d'une autre façon. Cette hypothèse, comme la précédente, ne peut malheureusement pas être vérifiée puisque la souche de mycobactéries n'a pas été isolée. Il est possible que les larves soient porteuses d'une souche lysogène qui, comme nous l'avons déjà rappelé, est toujours accompagnée d'une petite

quantité de phage libre. Or, comme les bactéries lysogènes ne sont pas lysables par leur propre phage, la présence de bactéries non lysées serait parfaitement normale.

Il reste encore à expliquer la disparition des mycobactéries au moment de la nymphose ; cette disparition ne peut certainement pas être due au bactériophage, puisque, même chez les larves où aucun bactériophage n'a pu être isolé, on note la disparition totale des bacilles acido-alcoolo-résistants à la fin du stade larvaire ; en outre, il serait difficile d'expliquer pourquoi le bactériophage n'interviendrait qu'à ce moment et pas à un autre.

Il faut admettre, mais c'est une simple hypothèse, que plusieurs phénomènes sont superposés. Le bactériophage n'est pas, comme nous le pensions au début, le « principe bactéricide thermolabile » de Violle et Sautet. Mais ce « principe » existe, et il est actif sur les colibacilles ; il est possible qu'il ait aussi une action sur les mycobactéries. Il est également possible qu'une substance bactéricide analogue, mais ne s'attaquant qu'aux mycobactéries, se trouve également dans le tube digestif des *Culex* au début de la nymphose. Enfin, il existe peut-être un principe bactéricide thermostable chez les adultes, et actif sur les mycobactéries.

Les réponses à ces questions n'ont pas encore été données, et il y aurait là un sujet d'étude très vaste.

Etude du bactériophage « Cossonay »

a) Vérification de la nature du principe lytique isolé.

On sait que certaines souches de bactéries libèrent lors de leur croissance des substances appelées bactériocines, capables de tuer ou d'empêcher la croissance d'autres souches appartenant à la même espèce. Les mycobactéries ne font pas exception, ainsi que nous l'avons déjà signalé [**39**]. Nous avons dit d'autre part que, lors de certains essais d'isolement (eaux provenant de la Clinique Sylvana, larves de moustiques, excréments de cobayes), des phénomènes d'inhibition avaient été observés au premier passage seulement. Si la substance inhibitrice est très concentrée, l'action qu'elle exerce peut encore être notée au deuxième passage, voire même au troisième, mais rarement plus loin.

Par contre, si nous faisons des passages en série avec le filtrat obtenu à partir de la culture du tube digestif de la larve provenant de Cossonay, le phénomène subsiste ; il augmente même d'intensité du premier au cinquième passage, pour se stabiliser ensuite. C'est là une des caractéristiques principales d'un bactériophage.

Une autre propriété du bactériophage est sa filtrabilité. Le principe lytique que nous avons isolé passe à travers une bougie Chamberland L3.

Enfin, la morphologie des bactériophages est si caractéristique qu'elle permet de les distinguer d'une façon indiscutable des autres virus.

Un examen rapide au microscope électronique a montré que notre principe lytique était bien un bactériophage. La preuve étant faite de la nature de ce principe, nous avons ensuite étudié quelques-unes de ses propriétés.

b) Spectre d'action.

Le bactériophage « Cossonay », comme nous l'avons déjà signalé, attaque une souche de *Mycob. smegmatis* (N° 909).

Il est rare qu'un bactériophage s'attaque spécifiquement à une seule souche de bactéries. Le plus souvent, un bactériophage est capable de lyser plusieurs espèces appartenant au même genre. Ainsi, le *Phagus smegmatis* de Penso s'attaque non seulement à différentes souches de *Mycob. smegmatis,* mais encore à un certain nombre d'autres mycobactéries, parmi lesquelles *Mycob. phlei* 525, *Mycob. stercoris* 3820 et 3821, etc. [**12**]. De même, la souche B_1 de Takeya et Yoshimura [**28**] s'attaque à des germes aussi différents que *Mycob. tuberculosis* var. *hominis* (18 souches), var. *bovis* (1 souche), var. *avium* (3 souches), var. *muris* (1 souche), à une souche de mycobactéries d'animaux à sang froid et à 37 souches de mycobactéries saprophytes.

Par contre, il est assez rare qu'une souche de bactériophage s'attaque à des genres différents. Quelques exemples ont toutefois été cités. D'Hérelle, en 1926 [**47**], note l'existence d'une souche pure de bactériophage qui attaque certaines espèces de *Shigella,* certaines espèces d'*Esche-*

richia et quelques souches de *Salm. paratyphi B.* On connaît aussi le cas d'un bactériophage anti-pesteux qui lyse également certaines espèces de *Salmonella* et de *Shigella* [**48**].

Avant d'étudier en détail le spectre d'action du bactériophage « Cossonay » parmi les mycobactéries, nous avons voulu nous assurer que ce phage attaque spécifiquement les mycobactéries et non pas des germes appartenant aux autres genres.

A notre connaissance, les seuls cas de bactériophages anti-mycobactéries s'attaquant à des germes d'autres genres ont été signalés par Froman [**13**] qui, dans son étude en vue d'une typisation de bacilles acido-alcoolo-résistants autres que les bacilles tuberculeux, note que plusieurs des bactériophages étudiés sont capables de lyser également certaines *Nocardia,* germes qui se rapprochent par plusieurs points des mycobactéries, en particulier par une acido-alcoolo-résistance dans certaines conditions.

A. Action du bactériophage « Cossonay » sur des germes autres que les mycobactéries.

Tous les essais ont été faits en milieu liquide. Les souches, reçues à l'état lyophilisé du C. I. C. C. de Lausanne, ont été mises en culture et repiquées deux fois en bouillon avant d'être essayées. Nous avons ensemencé 2 gouttes de culture microbienne et 0,5 cc de phage dans 5 cc de bouillon. Pour chaque essai, nous avons fait un témoin sans bactériophage. La lecture a été faite quand le témoin avait poussé abondamment.

Nos essais ont porté sur les germes suivants : *Staphylococcus aureus* (2 souches), *Staphylococcus albus* (2 souches), *Staphylococcus citreus* (1 souche), *Streptococcus pyogenes* (5 souches), *Bacillus subtilis* (4 souches), *Bacillus anthracis* (4 souches), *Corynebacterium diphteriae* (2 souches), *Cor. pseudodiphtericum* (2 souches), *Cor. cutis commune* (2 souches), *Diplococcus pneumoniae* (4 souches), *Escherichia coli* (5 souches), *Salmonella typhi* (2 souches), *Salm. paratyphi A* (2 souches), *Salm. paratyphi B* (2 souches), *Salm. paratyphi C* (2 souches), *Salm. typhi murium* (2 souches), *Proteus vulgaris* (2 souches), *Proteus morganii* (2 souches), *Shigella dysenteriae* (2 souches), *Sh. paradysenteriae* (2 souches), *Sh. sonnei* (2 souches), *Sh. boydii* (2 souches) et *Sh. flexneri* (2 souches).

Toutes ces souches avaient été choisies parmi des souches sensibles à leur propre bactériophage.

Résultats : le bactériophage « Cossonay » ne lyse aucune des 57 souches examinées. Il est donc permis de conclure que, dans la limite de nos essais, ce bactériophage s'attaque spécifiquement aux mycobactéries.

B. Essais avec des bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires.

Bien que cette étude soit limitée aux mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux, il est intéressant de savoir si le phage « Cossonay » lyse les bacilles tuberculeux.

Les essais ont été faits parallèlement avec deux systèmes de culture différents :

1°) Milieu de Löwenstein comme couche de base, et gélose molle Bordet-Gengou contenant les bacilles à tester.

2°) Milieu de Bordet-Gengou comme couche de base, et gélose molle Bordet-Gengou contenant les bacilles à tester.

Dans les deux cas, les bacilles servant à ensemencer la gélose molle ont été cultivés dans le milieu de DUBOS [**44**]. Les cultures ont été ensuite centrifugées et lavées deux fois dans de l'eau physiologique, afin d'éliminer toute trace de milieu de culture, qui, comme nous l'avons déjà signalé, contient un produit chimique, le Tween 80, lequel empêche la fixation des phages sur les mycobactéries, et par conséquent tout phénomène de lyse.

Une goutte de bactériophage est déposée à la surface de la gélose molle contenant les bactéries ; la technique employée est identique par ailleurs à celle qui a été décrite à la page 17, à cette différence près que les cultures sont laissées à l'étuve pendant un temps beaucoup plus long.

Le temps d'incubation varie entre trois et cinq semaines. Afin d'éviter le dessèchement du milieu de culture, les boîtes sont fermées hermétiquement au moyen d'une bande de cellulose adhésive le deuxième ou le troisième jour.

Au total, 40 souches de bacilles tuberculeux humains fraîchement isolés, 5 souches de bacilles tuberculeux bovins et 5 souches de bacilles tuberculeux aviaires provenant du C. I. C. C. ont été examinées. Tandis qu'aucune lyse n'était observée avec les souches bovines et aviaires, nous avons trouvé 6 souches humaines sensibles au bactériophage « Cossonay ». Dans ces 6 cas, du reste, la lyse était faible (présence de cultures secondaires) et n'était visible que sur les plaques ayant comme base du milieu de Bordet-Gengou, tandis qu'aucun phénomène de lyse n'était visible sur les plaques ayant comme base du milieu de Löwenstein.

Les cultures sont très faibles sur le milieu de Bordet-Gengou, et les lyses sont d'autant plus difficiles à voir que les cultures secondaires sont, dans certains cas, presque aussi abondantes que le reste de la culture.

Nous avons essayé d'obtenir des plages avec le phage « Cossonay » et les souches sensibles, mais nous n'avons pas réussi. Cet échec est probablement dû au fait que les cultures secondaires masquent complètement les plages qui se forment. Nous avons en effet observé un phénomène analogue avec des mycobactéries saprophytes, avec lesquelles les cultures secondaires sont si abondantes qu'on ne peut pas voir les plages, pourtant d'un diamètre important. Ce n'est qu'en répétant les essais, en faisant varier les quantités de bactéries ensemencées, et en faisant varier aussi l'incidence de la lumière au moment de l'observation que nous avons pu, dans un seul cas parmi plusieurs, et chez des mycobactéries saprophytes seulement, observer ces plages et mesurer leur diamètre.

Avant de laisser de côté les bacilles tuberculeux pour passer à l'étude des mycobactéries saprophytes, nous tenons encore à insister sur l'intérêt que peut présenter l'emploi des phages avec des bacilles tuberculeux, aussi bien à des fins de classification que dans des buts épidémiologiques.

C. Essais avec des mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux.

La technique employée pour l'étude de la sensibilité des mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux au bactériophage « Cossonay » est la même que celle qui a été décrite pour la recherche de bactériophage dans

les filtrats des cultures de terre et de divers produits pathologiques (page 17).

Toutes les souches étudiées ont été reçues du C. I. C. C. de Lausanne, sous forme lyophilisée. Après un repiquage en bouillon et deux passages dans ce même milieu, les souches ont été cultivées au fur et à mesure des besoins dans des tubes de bouillon contenant des perles de verre, afin de pouvoir obtenir facilement des suspensions homogènes de bactéries.

Comme les mycobactéries étudiées ont des origines très diverses, et que, bien souvent et faute d'une nomenclature suffisante, nous devons les appeler *Mycobacterium sp.*, nous donnons, dans les pages qui suivent, l'inventaire de toutes les souches que nous avons manipulées au cours de nos recherches.

Liste des mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux citées dans cette étude.

No du C.I.C.C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
15	*Mycob. sp.*	Institut Pasteur, Paris (souche TEA)	[49] [50]
17	*Mycob. ranae*	Trudeau, New-York	—
28	*Mycob. sp.*	Institut Pasteur, Paris (eau de la Seine)	[49] [51]
38	*Mycob. sp.*	Dr Tarshis, Kennedy Hosp. Memphis, Tenn. USA	—
51/o	*Mycob. sp.*	Cobaye inoculé avec des organes de rat + paraffine	[52]
52	*Mycob. sp.*	Service des analyses, Institut d'Hygiène, Lausanne (acné comédon)	—
54/b	*M. friedmannii*	Institut Pasteur, Paris (bacille de la tortue)	—
54/o	*M. friedmannii*	Institut Pasteur, Paris (bacille de la tortue, variété orange)	—
55/b	*Mycob. sp.*	Cobaye inoculé avec la souche Grassberger (pigment blanc)	—
55/o	*Mycob. sp.*	Cobaye inoculé avec la souche Grassberger (pigment orange)	—
59	*Mycob. sp.*	Institut Pasteur, Paris (souche Rabinowitch)	—
60	*Mycob. sp.*	Institut Pasteur, Paris (souche Mœller)	—
61	*Mycob. phlei*	Institut Pasteur, Paris	—
62	*M. thamnopheos*	Institut Pasteur, Paris	—
63	*Mycob. sp.*	Service des analyses Institut d'Hygiène, Lausanne (ostio-folliculite du cuir chevelu)	[52]
67	*Mycob. sp.*	Terre (la souche n'existe plus)	—
68	*Mycob. sp.*	Cobaye inoculé avec une expectoration + huile de paraffine	[52]
70	*Mycob. sp.*	Institut d'Hygiène, Lausanne (sable de route)	[52]
71	*Mycob. sp.*	Institut d'Hygiène, Lausanne (terre)	[52]

No du C. I. C. C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
75	*Mycob. sp.*	Dr H. Gaschen, Lausanne *(Culex pipiens)*	–
76	*Mycob. sp.*	Prof. Galli-Valerio, Lausanne (fumier)	–
77	*Mycob. sp.*	Prof. Galli-Valerio, Lausanne (raclage de robinets)	[49]
78	*Mycob. sp.*	Institut Robert Koch, Berlin	–
81	*Mycob. sp.*	Institut Pasteur, Paris (souche Pellegrini)	[53]
84	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo, Rio de Janeiro (lésion lépreuse)	–
85	*Mycob. sp.*	Identique à la souche 84, mais reprise d'un cobaye	–
86	*Mycob. sp.*	Identique à la souche 84, mais reprise d'un rat blanc	–
88	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo, Rio de Janeiro (lésion lépreuse). Souche obtenue à partir d'une infection expérimentale chez *Amblyomma cajennense* (souche Teixeira N° 3)	–
89	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo, Rio de Janeiro (lésion lépreuse). Isolé de *Boophilus microphilus* (souche Rantum N° 4)	–
90	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo, Rio de Janeiro (lésion lépreuse). Isolé de *Boophilus microphilus* (souche Rudan N° 5)	–
93	*Mycob. sp.*	Isolé par Celso Rossel (lésion lépreuse)	–
94	*Mycob. sp.*	Isolé d'une larve de *Pulex irritans* nourrie avec une émulsion de léprome (souche 34 E, Dr Rivas, Bogota, Colombie)	–
133	*M. butyricum*	NCTC 333 (*)	
134	*Mycob. sp.*	NCTC 509 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
135	*Mycob. sp.*	NCTC 510 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
136	*Mycob. sp.*	NCTC 512 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
137	*Mycob. sp.*	NCTC 513 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
139	*Mycob. sp.*	NCTC 522 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
143	*Proactinomyces rubropertinctus*	NCTC 1468 *(Mycob. rubrum)*	–
144	*Mycob. sp.*	NCTC 1542 (« cold blooded type »)	–
145	*Mycob. piscium*	NCTC 2014 (d'un caïman)	–
149	*M. salmonicolor*	NCTC 2873	–
150	*Mycob. sp.*	NCTC 2891 (« Frog bacillus » de Moeller)	–
152	*M. stercoris*	NCTC 3820	–
153	*Mycob. rubrum*	NCTC 4565	–

(*) NCTC : National Collection of Type Cultures, Londres.

No du C. I. C. C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
154	*Mycob. sp.*	NCTC 4566 (ass. avec des lésions lépreuses)	—
171	*Mycob. phlei*	NCTC 54	—
172	*M. butyricum*	NCTC 334	—
173	*Mycob. sp.*	NCTC 511 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
174	*Mycob. sp.*	NCTC 515 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
175	*Mycob. sp.*	NCTC 516 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
176	*Mycob. sp.*	NCTC 517 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
178	*Mycob. sp.*	NCTC 2071 (souche Karlinski)	[55]
180	*M. chelonei*	Laboratoire Léon Joly, Paris (souche 5541)	[56]
182	*M. stercoris*	NCTC 3821	—
184	*Mycob. sp.*	NCTC 519 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
185	*Mycob. sp.*	NCTC 521 (ass. avec des lésions lépreuses)	[54]
188	*Mycob. phlei*	NCTC 1471	—
191	*Mycob. sp.*	Prof. Bezançon (liquide pleural)	—
194	*Mycob. sp.*	Prof. Bezançon (culture de mœlle reprise d'un cobaye)	—
195	*Mycob. sp.*	Prof. Bezançon (urine)	—
214	*Mycob. sp.*	Dr Jean Desbordes (souche F3)	[57]
229	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : Souche Stefansky II	—
230	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : souche Stefansky III	—
233	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : souche Hecke	—
234	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : souche Chaves I	—
235	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : souche Chaves II	—
237	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse) : souche Emilia	—
239	*Mycob. sp.*	Dr de Souza Araujo (lésion lépreuse expérimentale) : souche Emilia	—
521	*Mycob. sp.*	Dr S. Froman, Olive View, Calif. (souche F 21 = ATCC 607) (*)	[32] [58]
522	*M. lacticola*	Dr S. Froman, Olive View, Calif. (souche F 13)	[32]
523	*Mycob. sp.*	Dr S. Froman, Olive View, Calif. (souche F 130)	[32]
524	*Mycob. sp.*	Dr S. Froman, Olive View, Calif. (souche F 119)	[32]
602	*Mycob. phlei*	Trudeau, New-York	—

(*) ATCC : American Type Culture Collection, Washington.

No du C. I. C. C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
620	*Mycob. sp.*	Professeur Valls-Conforto, Barcelone (d'un malade vacciné à répétition avec du BCG). Souche reçue comme *M. tuberculosis* var. ? Pousse sur les milieux ordinaires	–
689	*Mycob. phlei*	Institut de Biologie physico-chimique, Paris	–
690	*Mycob. smegmatis*	Institut de Biologie physico-chimique, Paris	–
711	*Mycob. sp.*	Dr P. Lallouette, Jouy-en-Josas, (S. et O.) Mycob. SAPC, souche A	–
712	*Mycob. sp.*	Dr P. Lallouette, Jouy-en-Josas, (S. et O.) Mycob. SAPC, souche B	–
713	*Mycob. sp.*	Dr P. Lallouette, Jouy-en-Josas. (S. et O.) Mycob. SAPC, souche C	–
714	*Mycob. sp.*	Dr P. Lallouette, Jouy-en-Josas. (S. et O.) Mycob. SAPC, souche D	–
725	*Mycob. phlei*	Dr Hubácek, Prague souche acido-alcoolo-résistante	[59]
726	*Mycob. phlei*	Dr Hubácek, Prague résistante à la streptomycine ; souche acido-alcoolo-résistante	[59]
727	*Mycob. phlei*	Dr Hubácek, Prague souche non acido-alcoolo-résistante	[59]
728	*Mycob. phlei*	Dr Hubácek, Prague résistante à la streptomycine ; souche non acido-alcoolo-résistante	[59]
798	*Mycob. sp.*	ATCC 607	[58]
799	*Mycob. sp.*	ATCC 599	[58]
801	*Mycob. sp.*	Rome 3403 (*) (insecte non identifié)	–
804	*Mycob. sp.*	Rome 2208 (*Musca domestica* ailée)	–
806	*Mycob. sp.*	Rome 3628 (*Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	–
807	*Mycob. sp.*	Rome 3375 *(Molops piceus)*	–
810	*Mycob. sp.*	Rome 8091 (*Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	–
813	*Mycob. sp.*	Rome 2389 (*Musca domestica* ailée)	–
814	*Mycob. sp.*	Rome 2184 (Intestin d'*Athene noctua*)	–
817	*Mycob. sp.*	Rome 2079 (*Musca domestica* ailée)	–

(*) Souches de Rome : elles proviennent de l'Institut Supérieur de la Santé (Istituto Superiore di Sanità).

No du C.I.C.C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
818	*Mycob. sp.*	Rome 2048 (*Musca domestica* ailée)	–
820	*Mycob. sp.*	Rome 1862 (fumier)	–
822	*Mycob. sp.*	Rome 1817 (origine inconnue)	–
823	*Mycob. sp.*	Rome 1857 (engrais)	–
829	*Mycob. sp.*	Rome ... (?) (expectoration)	–
834	*Mycob. sp.*	Rome 2004 *(Sarcophaga falculata)*	–
835	*Mycob. sp.*	Rome 2013 *(Musca domestica* ailée)	–
838	*Mycob. sp.*	Rome 2048 (intestin de *Carassius)*	–
841	*Mycob. sp.*	Rome 2066 *(Musca domestica* ailée)	–
843	*Mycob. sp.*	Rome 2070 *(Musca domestica* ailée)	–
846	*Mycob. sp.*	Rome 2103 *(Musca domestica* ailée)	–
847	*Mycob. sp.*	Rome 2104 *(Musca domestica* ailée)	–
849	*Mycob. sp.*	Rome 2114 *(Musca domestica* ailée)	–
853	*Mycob. sp.*	Rome 2122 *(Musca domestica* ailée)	–
857	*Mycob. sp.*	Rome 2143 *(Musca domestica* ailée)	–
858	*Mycob. sp.*	Rome 2153 *(Musca domestica* ailée)	–
860	*Mycob. sp.*	Rome 2155 *(Musca domestica* ailée)	–
861	*Mycob. sp.*	Rome 2156 *(Locusta viridissima)*	–
865	*Mycob. sp.*	Rome 2215 (origine inconnue)	–
867	*Mycob. sp.*	Rome 2247 *(Musca domestica,* chrysalide)	–
868	*Mycob. sp.*	Rome 2248 *(Musca domestica,* chrysalide)	–
871	*Mycob. sp.*	Rome 2279 *(Musca domestica* ailée)	–
872	*Mycob. sp.*	Rome 2283 *(Musca domestica* ailée)	–
882	*Mycob. sp.*	Rome 2532 (larve d'insecte, non identifiée)	–
883	*Mycob. sp.*	Rome 2641 *(Musca domestica* ailée)	–
884	*Mycob. sp.*	Rome 2725 *(Musca domestica* ailée)	–
885	*Mycob. sp.*	Rome 3047 (larve d'insecte, non identifiée)	–

No du C.I.C.C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
887	*Mycob. sp.*	Rome 3348 *(Blaps martisaga)*	–
890	*Mycob. sp.*	Rome 3435 (insecte non identifié)	–
891	*Mycob. sp.*	Rome 4549 *(Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	–
892	*Mycob. sp.*	Rome 4771 *(Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	–
895	*Mycob. sp.*	Rome 8097 *(Musca domestica,* désinfectée par immersion dans le phénol)	–
897	*Mycob. sp.*	Rome 8099 *(Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	–
898	*Mycob. sp.*	Rome 8121 *(Musca domestica* ailée, désinfectée par immersion dans le phénol)	
900	*Mycob. sp.*	Dispensarios Blanco, Barcelone. Expectoration du malade H. S.	[60]
904	*Mycob. sp.*	Dispensarios Blanco, Barcelone. Isolé d'un robinet de l'Institut antituberculeux	[60]
906	*Mycob. sp.* « Pellegrino »	Prof. Penso, Rome (souche test pour le phage « Pellegrino »)	[12]
907	*Mycob. sp.* « Rabinowitch »	Prof. Penso, Rome (souche test pour le phage « Rabinowitch »)	[12]
908	*M. friburgensis*	Prof. Penso, Rome (souche test pour le phage « lacticola »)	[12]
909	*M. smegmatis*	Prof. Penso, Rome (souche test pour le phage « smegmatis »)	[12]
910	*Mycob. sp.*	Prof. Penso, Rome (souche test pour le phage « phlei »)	[12]
1024	*M. fortuitum*	Prof. Wells, Oxford	[61]
1030	*Mycob. sp.*	Prof. Carrère, Montpellier (liquide céphalo-rachidien d'un enfant atteint de méningite lymphocytaire)	–
1101	*M. fortuitum*	Dr E. Agius, Malte (souche identique à la souche 1024)	[62]
1114	*Mycob. sp.*	Prof. Penso, Rome (ATCC 607)	[58]
1223	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-1	–
1224	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-2	–
1225	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-4	–

No du C. I. C. C. Lausanne	*Nom*	*Origine, remarques*	*Réf.*
1227	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-7	—
1229	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie, (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-11	—
1233	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie, (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-23	—
1237	*Mycob. sp.*	Dr Paula Meislowa, Varsovie, (collection du Dr Paryski, Zakopane) Souche S-31	—
1241	*Mycob. sp.*	Dispensaire départemental antituberculeux, Varsovie Souche WP-1	—
1244	*Mycob. sp.*	Dispensaire départemental antituberculeux, Varsovie Souche WP-5	—
1246	*Mycob. sp.*	Dispensaire départemental antituberculeux, Varsovie Souche WP-7	—
1247	*Mycob. sp.*	Dispensaire départemental antituberculeux, Varsovie Souche WP-8	—

Dans notre étude du spectre d'action du bactériophage « Cossonay », nous avons utilisé tout d'abord 25 souches de mycobactéries, dont un certain nombre se sont révélées sensibles. Nous donnons ci-dessous les résultats de ces premiers essais.

Souches sensibles : 172, 521, 908, 909.

Souches résistantes : 15, 28, 38, 51/o, 52, 55/o, 75, 150, 154, 171, 178, 188, 229, 230, 235, 237, 239, 522, 523, 524 et 910.

Nous avions donc à ce moment entre les mains 4 souches sensibles, dont nous avons voulu examiner le comportement plus en détail.

Le bactériophage « Cossonay », dont nous possédions une certaine quantité, ne se comporte pas de la même façon vis-à-vis de ces 4 souches.

En milieu liquide, toutefois, il n'y a que peu de différences. Si l'on a ensemencé en même temps une petite quantité de bactéries et du bactériophage dans un tube de bouillon, la culture reste claire après un séjour de 48 heures à l'étuve, tandis que le témoin sans phage pousse abondamment. D'autre part, pour les 4 souches étudiées, le bactériophage « Cossonay » est incapable de lyser une culture bactérienne suffisamment abondante pour que le trouble se voie à l'œil nu.

Si on abandonne les cultures claires plus longtemps à l'étuve, des cultures secondaires apparaissent, mais pour les souches 172 et 908 seulement.

En milieu solide, par contre, les différences de comportement entre les 4 souches sont plus importantes.

1°) *Morphologie des plages.*

Les plages ont de 0,5 à 1 mm de diamètre pour la souche 172, de 0,1 à 3 mm pour la souche 521, de 0,1 à 1 mm pour la souche 908 et de 0,5 à 3 mm pour la souche 909.

Les plages des souches 172 et 908 sont généralement troubles à cause des cultures secondaires, tandis que celles des souches 521 et 909 sont claires.

2°) *Mesure du titre du phage.*

Au moyen de la même préparation de phage « Cossonay », nous avons fait des dilutions de 10 en 10 qui ont été titrées vis-à-vis des 4 souches sensibles (172, 521, 908 et 909). Les résultats obtenus ont été très différents les uns des autres. Sans citer les chiffres réels, nous dirons simplement qu'à un titre de 10^8 pour 521 correspondait un titre de 10^8 également pour 909, de 10^6 pour 908 et de 2.10^3 seulement pour 172. De tels écarts surprennent, évidemment, mais ce phénomène est connu. Ces différences de titre peuvent avoir des causes diverses, sur lesquelles nous reviendrons. Nous indiquerons tout d'abord quelques propriétés physiques du phage « Cossonay ».

c) Quelques propriétés physiques du bactériophage « Cossonay ».

A. Actions de la congélation et de la dessiccation.

Un des problèmes les plus importants de la microbiologie est celui de la conservation des organismes. Le stockage et la distribution des souches microbiennes ont pris ces dernières années une importance considérable ; l'échange de souches intéressantes entre les différents laboratoires est des plus fructueux pour la recherche. L'utilisation des souches types pour les essais des vitamines et des antibiotiques l'ont même rendu nécessaire.

La lyophilisation, ou dessiccation sous vide, a apporté à ce problème une solution pratique, qui est utilisée par la majorité des collections de types microbiens existant à l'heure actuelle.

Nous avons déjà dit plus haut que toutes les souches de mycobactéries que nous avons utilisées sont conservées à l'état lyophilisé par le Centre International de Collections de Cultures de Lausanne (C.I.C.C.) (*). La conservation des bactéries par la lyophilisation est maintenant assurée, et chaque chercheur isolant une souche nouvelle intéressante peut la confier à une collection ; cela évitera que la souche se perde, et de cette façon tous ceux qui voudront répéter les expériences et les travaux de l'auteur pourront le faire facilement.

La plupart des microorganismes (bactéries, levures, champignons, virus) peuvent supporter la lyophilisation. Si, pour certains d'entre eux,

---

(*) Le C. I. C. C. a pris récemment le nom de « Centre International de Distribution de Souches et d'Informations sur les Types Microbiens ».

l'opération se solde par une très grande perte en éléments viables, de récents perfectionnements et de nouvelles techniques permettent maintenant d'améliorer les résultats.

Le problème de la conservation intéresse également les bactériophages, surtout au point de vue de la lysotypie. En effet, cette technique étant entrée en pratique pour de nombreux germes, il est nécessaire que chaque laboratoire voulant l'utiliser puisse disposer facilement de tous les phages.

Comme la sensibilité des organismes à la lyophilisation varie passablement d'un genre à l'autre, et même parfois d'une souche à l'autre dans un même genre, il est indispensable de faire des essais avec tout nouvel organisme qu'on désire conserver par ce moyen, afin de voir qu'il supporte ou non l'opération. Le bactériophage ne fait pas exception.

La conservation du bactériophage ne pose du reste pas les mêmes problèmes que la conservation des bactéries. A part un certain nombre d'autres avantages sur lesquels nous reviendrons, la lyophilisation permet d'éviter les repiquages périodiques qu'il y aurait lieu de faire si les bactéries étaient conservées dans des milieux de culture. Pour être repiquables, les bactéries, si elles ne sont pas lyophilisées, doivent être en effet changées de milieu régulièrement ; sans cette précaution, elles meurent. Les repiquages constants demandent un personnel nombreux. La lyophilisation évite ces désagréments.

Le bactériophage, par contre, n'a pas besoin d'être repiqué pour être conservé, si on a pris soin de le filtrer. En effet, en l'absence de bactéries, le bactériophage ne peut pas se multiplier, ce qui évite l'usure du milieu et la production de déchets du métabolisme, causes principales de la mort des microorganismes dans les cultures âgées.

La stabilité du bactériophage dépend du milieu où est faite la suspension ; cette stabilité est meilleure, par exemple, dans du bouillon que dans l'eau physiologique. En bouillon, les bactériophages peuvent se conserver des années à la température ambiante, à condition que les ampoules soient tenues à l'abri de la lumière. A la glacière, la conservation est encore meilleure. Dans les deux cas, cependant, on constate une diminution régulière du titre.

Si le seul avantage de la lyophilisation était la durée de la conservation, elle serait pratiquement inutile pour le bactériophage, car cette opération, pour pratique qu'elle soit, nécessite un appareillage coûteux. Mais la lyophilisation offre encore d'autres avantages. L'enlèvement de l'eau permet de conserver la même quantité d'éléments vivants sous un volume et un poids très réduits, ce qui facilite le stockage et l'envoi par la poste.

Nous avons donc voulu voir si le bactériophage que nous avons isolé résiste — et dans quelle mesure — à la lyophilisation. Avant de décrire nos essais et les résultats qu'ils ont donnés, nous allons rappeler brièvement le principe de la lyophilisation.

La lyophilisation (ou cryo-dessiccation) est une opération qui consiste à congeler brusquement un liquide contenant des éléments en suspension (ou des

substances dissoutes), puis à évaporer sous vide (c'est-à-dire à sublimer) la glace qui s'est formée, de façon à dessécher aussi parfaitement que possible le produit soumis à l'opération.

Toutes sortes d'appareillages ont été proposés, sur lesquels nous ne voulons pas nous attarder. L'appareil que nous avons utilisé dans nos essais permet la lyophilisation de 175 ampoules à la fois ; le froid nécessaire à la congélation est fourni par un mélange neige carbonique — acétone. Le vide est produit par un système de deux pompes, l'une à palettes et l'autre à diffusion d'huile, entre lesquelles est intercalé un condenseur à basse température, jouant le rôle de piège à vapeur d'eau, afin d'éviter l'entrée de cette vapeur dans la pompe à palettes.

La lyophilisation donne en général de mauvais résultats si la suspension est faite dans un milieu pauvre en protéines, comme l'eau physiologique et le bouillon. Le rendement est par contre fortement amélioré si on ajoute une substance appelée « protecteur ». Ce protecteur peut être du sérum, du « Subtosan » (plasma artificiel), ou même du lait. Certaines substances non protéiques peuvent également jouer ce rôle, comme par exemple les solutions de sucres. La manière exacte avec laquelle le protecteur agit n'est pas encore connue.

Comme la lyophilisation se fait en deux étapes bien distinctes (congélation, puis dessiccation), nous avons voulu étudier séparément les deux opérations. Dans une première série d'essais, nous avons déterminé l'action de la congélation sur la vitalité du bactériophage « Cossonay ».

1) *Congélation.*

Quatre séries d'essais ont été pratiquées : la première avec du bactériophage sans protecteur (suspension en bouillon), la deuxième avec du phage mélangé en proportions égales avec du sérum de bœuf décomplémenté, la troisième avec du phage mélangé en proportions égales avec du Subtosan, et la quatrième avec du phage mélangé en proportions égales avec une solution de glucose à 10 %.

Les numérations ont été faites au moyen de la souche 909, selon la technique décrite à la page 11.

Les 4 préparations de phage ont été réparties dans des ampoules à fond plat, à raison de 1 cc par ampoule. Les ampoules ont été ensuite congelées en les plongeant dans un mélange de neige carbonique et d'acétone pendant 10 minutes. Nous n'avons pas utilisé d'appareil permettant de connaître la température exacte du contenu des ampoules, mais il est certain que la congélation se fait très rapidement, en une vingtaine de secondes tout au plus.

Ensuite, les ampoules ont été décongelées très lentement, à la température du laboratoire. Les suspensions revenues à l'état liquide ont été alors diluées convenablement dans du bouillon, puis titrées. Cinq titrations ont été faites pour chaque ampoule, afin de diminuer l'erreur possible.

Nous donnons ci-dessous les résultats moyens :

	Titre avant congélation	*Titre après congélation*
Phage seul	$6{,}70 \times 10^8$	$7{,}70 \times 10^8$
Phage + « Subtosan »	$3{,}35 \times 10^8$ (*)	$4{,}13 \times 10^8$
Phage + sérum	$3{,}35 \times 10^8$ (*)	$3{,}94 \times 10^8$
Phage + glucose 10 %	$3{,}35 \times 10^8$ (*)	$4{,}81 \times 10^8$

Tableau 1

(*) Le titre est ici deux fois plus faible, à cause de l'adjonction d'un protecteur liquide.

On note une augmentation nette du titre, aussi bien en présence qu'en absence de protecteur. Une telle augmentation peut surprendre à première vue, mais le phénomène est connu et a été expliqué de la façon suivante : au moment de la libération des phages par la bactérie lysée, les particules se trouvent en amas plus ou moins importants ; très rapidement, ces amas se dissocient pour donner des phages isolés. Mais il subsiste toujours une petite quantité d'amas non dissociés, en particulier dans les suspensions de titre élevé. Leur nombre diminue parfois si les surspensions sont conservées un certain temps à la glacière.

Il ne faut pas oublier que toutes les méthodes de titration, telles qu'elles sont employées à l'heure actuelle, et qui sont basées sur le nombre de plages données par une quantité déterminée de bactériophage, ne donnent pas l'indication exacte du nombre de phages, mais simplement celle du nombre de centres infectieux. Un amas de phages ne donnera bien entendu qu'une seule plage, d'où l'erreur. Après un séjour au froid, il n'y a donc qu'une augmentation apparente du nombre de phages (il ne peut pas y avoir une telle augmentation en l'absence de bactéries sensibles). Seul le nombre de centres infectieux devient plus grand.

Si nous revenons maintenant au cas qui nous occupe, nous pouvons tirer les mêmes conclusions, et admettre que l'augmentation apparente du titre est due à la rupture des derniers amas de phages, amas qui sont dissociés par la congélation et la décongélation successives.

Les différences d'augmentation du titre observées entre les essais faits avec le phage seul et les essais faits avec le phage additionné de « protecteurs » ne sont pas significatives, parce qu'elles sont relativement peu importantes. Il semble toutefois que l'adjonction de « protecteurs » favorise quelque peu la dissociation des amas.

En conclusion de cette première partie des essais de lyophilisation, on peut remarquer que la congélation brusque et la décongélation ne nuisent en rien à la viabilité des bactériophages, qui supportent parfaitement bien les deux opérations. Disons enfin que nous avons fait une nouvelle série d'essais analogues, afin de nous assurer qu'aucune erreur n'avait été commise. Les résultats obtenus ont confirmé les premiers.

2) *Dessiccation.*

La deuxième partie de nos essais a été consacrée à l'étude de l'influence de la dessiccation, qui est la seconde phase de la lyophilisation. Comme la dessiccation doit se faire immédiatement après la congélation, qui ne demande elle-même que quelques secondes, nous avons repris l'opération dès le début, en partant du même bactériophage et en prenant les mêmes protecteurs que pour les essais de congélation.

Quatre lots d'ampoules contenant 1 cc de suspension ont été lyophilisés de la façon suivante : les ampoules ont été placées sur une des rampes de l'appareil, leur contenu a été congelé au moyen d'un mélange de neige carbonique et d'acétone, puis le vide a été fait. La pompe à palettes donne un vide suffisant pour permettre la sublimation de la glace ; quand la sublimation est terminée, ce qui s'observe facilement par le fait que les ampoules se réchauffent (le givre qui les couvre pendant la dessiccation disparaît), on enclenche la pompe à dif-

fusion et on court-circuite le condenseur devenu inutile. La pompe à diffusion permet d'obtenir un vide très satisfaisant (environ 10^{-5} mm Hg). La plupart des auteurs recommandent l'emploi d'un vide poussé, qui donne, semble-t-il, les meilleurs résultats. Ensuite, les ampoules sont scellées sous vide. L'intensité du vide est vérifiée à l'aide d'un appareil à haute fréquence.

Résultats : la lyophilisation en présence d'une solution de glucose à 10 % comme protecteur est pratiquement impossible ; en effet, toutes les ampoules préparées de cette façon ont été très lentes à se dessécher, et, à la fin de l'opération, alors que les ampoules contenant un autre protecteur étaient déjà sèches, celles qui contenaient la glucose s'étaient décongelées. Nous n'avons pas effectué de mesures sur ces ampoules.

Par contre, la lyophilisation s'est bien terminée our les autres, et quelques ampoules de chaque lot ont été prélevées, puis ouvertes, et la quantité nécessaire d'eau distillée a été ajoutée. La réhydratation se fait presque instantanément, surtout dans le cas du phage seul et dans le cas du phage additionné de « Subtosan ». Le contenu des ampoules a été dilué de 10 en 10, et chaque dilution a fait l'objet d'une titration. Les chiffres trouvés sont très bas. En présence de sérum dont le rôle protecteur semble nul, la perte atteint, pour toutes les ampoules, plus de 99,9 %. En présence de « Subtosan », les résultats sont légèrement meilleurs ; ils sont indiqués dans le tableau suivant :

Ampoule N°	*Perte*
1	99,5 %
2	98,5 %
3	99,4 %
4	99,8 %
Perte moyenne pour les 4 ampoules	*99,3* %

Tableau 2

Lyophilisation en présence de « Subtosan »

Enfin, les résultats les plus favorables sont obtenus avec les ampoules contenant du bactériophage lyophilisé sans protecteur. Sept ampoules de ce phage ont été titrées ; le tableau ci-dessous donne la perte pour chacune des ampoules :

Ampoule N°	*Perte*
1	93,6 %
2	87,0 %
3	98,8 %
4	99,8 %
5	85,5 %
6	96,6 %
7	99,3 %
Perte moyenne pour les 7 ampoules	*94,3* %

Tableau 3

Lyophilisation sans protecteur

Discussion : le calcul des pertes a été fait à partir du titre initial ; les chiffres auraient été encore plus élevés si les calculs avaient été faits à partir du titre qu'on mesure après la congélation et qui, comme nous l'avons montré plus haut, est légèrement plus important. De toute façon, c'est le titre final qui est intéressant. La perte est donc considérable ; les protecteurs qui donnent d'excellents résultats avec les bactéries n'ont aucune influence favorable sur la survie du bactériophage à la lyophilisation ; il semble même que leur action soit néfaste, puisque les résultats sont plus mauvais en présence de ces substances qu'en leur absence. Mais il est possible que d'autres substances pourraient jouer un rôle de protecteur et améliorer les résultats.

On remarque d'autre part des différences assez sensibles du titre final entre des ampoules qui contenaient au départ la même préparation, et qui ont subi le même traitement. Avant d'en donner l'explication, nous voulons examiner les résultats obtenus avec d'autres phages.

Des travaux sur la lyophilisation des mycobactériophages n'ont, à notre connaissance, jamais été publiés, mais nous savons que certains laboratoires emploient cette technique pour les conserver. Les résultats ne semblent du reste pas avoir été meilleurs que ceux que nous avons obtenus, car, parmi les ampoules de mycobactériophage lyophilisé que nous avons reçues, certaines n'ont pas donné de sous-culture, et d'autres ne contenaient qu'un nombre très petit de phages viables.

Un travail récent [**63**] étudie l'influence de la lyophilisation sur deux microorganismes différents mélangés, *Pseudomonas fluorescens* et le coliphage T2. L'avantage réside dans le fait qu'on peut comparer les résultats en étant sûr que les conditions de traitement ont été exactement les mêmes, puisque les deux organismes sont mélangés.

Les auteurs ont examiné en particulier l'influence de la concentration de la mannite et du saccharose utilisés comme protecteurs, seuls ou mélangés, ainsi que l'influence de la température à laquelle se fait la dessiccation. Les résultats sont des plus intéressants. Ils montrent que l'effet de la température dépend de la nature de la substance dissoute, ainsi que du microorganisme lyophilisé.

Les auteurs ont constaté que la viabilité de *Salmonella newport,* de *Pseudomonas fluorescens* et de *Vibrio metschnikovii,* ainsi que de T2 et T5 ne varie pratiquement pas quand la dessiccation se fait à —20° ou à 0 — 2° en présence de saccharose 0,5 M ; par contre, la température joue un rôle important quand l'opération se fait en présence de mannite 0,5 M, la viabilité étant fortement diminuée si la dessiccation se fait à basse température. L'étude comporte une analyse mathématique de l'influence de la température et de la concentration des sucres.

En ce qui concerne le bactériophage, les auteurs montrent que la plus grande proportion de phages viables est obtenue en pratiquant la dessiccation à 0° ou à 20°, en l'absence de saccharose et en présence de mannite. Dans ce cas le plus favorable, la perte atteint tout-de-même 70 %. Quand la température est plus basse, les pertes sont parfois plus élevées que celles que nous avons observées avec le mycobactériophage.

Pour obtenir le meilleur rendement possible, il faudrait, pour chaque phage, faire une série d'essais pour déterminer les conditions les meilleures.

Nous pensons que l'influence de la température à laquelle se fait la dessiccation peut expliquer la divergence des titres mesurés après lyophilisation sur des échantillons ayant subi le même traitement. Il est impossible, avec la technique que nous avons utilisée, d'obtenir une température égale dans toutes les ampoules. En effet, il y a à l'intérieur de chaque rampe une chute de vide régulière qui va du centre vers l'extrémité. Ces différences de vide font que la sublimation se fait à des vitesses différentes suivant l'endroit où est placée l'ampoule ; de ce fait, le refroidissement est également variable d'une ampoule à l'autre (le givre subsiste en effet plus longtemps sur certaines d'entre elles) et, par conséquent, la perte en éléments viables varie, elle aussi, d'une ampoule à l'autre.

Mais est-il bien nécessaire de chercher à obtenir un titre élevé ? Cela nécessiterait, comme nous l'avons vu, des études longues et nombreuses. Au point de vue théorique, il est évident que des recherches dans ce but sont intéressantes ; mais notre but étant simplement de trouver un moyen de conservation des bactériophages, les résultats obtenus, si mauvais soient-ils, sont encore acceptables. En effet, il suffit que l'ampoule contienne suffisamment de phages viables pour permettre une sous-culture. Or une sous-culture peut se faire à partir d'un nombre très restreint de phages ; théoriquement (et même pratiquement), un seul suffit. Il ne faut pas oublier qu'une perte de 99 %, si grande qu'elle puisse paraître, ne fait baisser le logarithme du titre que de deux unités. En partant d'une suspension contenant 10^8 phages par cc, nous obtiendrons encore 10^6 éléments viables avec une perte de 99 %, et 10^5 éléments viables si la perte atteint 99,9 %. Ces titres sont suffisamment élevés pour permettre l'obtention d'une grande quantité de sous-cultures.

A titre de comparaison, signalons pour terminer que le même bactériophage « Cossonay », conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante, subit une perte en éléments viables d'environ 99 % en une année.

Conclusions : la lyophilisation est applicable au phage « Cossonay », mais son emploi est assez limité, puisque la conservation sans précautions particulières donne des résultats à peu près comparables.

B. Sensibilité au chloroforme.

La filtration des lysats bactériophagiques provoque, ainsi que nous le verrons par la suite, une baisse sensible du titre. Dans certains cas, cette baisse est gênante, et divers moyens ont été proposés pour la supprimer. L'un des plus intéressants, tant par son efficacité que par sa simplicité, a été proposé en 1950 par Frédericq [**64**]. Cet auteur a montré que le chloroforme a une action bactéricide prononcée, tandis qu'il est sans effet, même après un temps de contact prolongé, sur les entérobacté-

riophages. Il suffit d'ajouter au lysat quelques gouttes de chloroforme, qu'on laisse agir pendant 30 minutes. Le chloroforme s'accumule au fond du tube à cause de son poids spécifique élevé, et le liquide surnageant peut être employé exactement comme un filtrat. Cette méthode est si commode qu'il nous a paru intéressant de voir si elle pouvait être appliquée au phage « Cossonay ».

Nos essais ont montré que le phage « Cossonay » ne supporte pas l'action du chloroforme. En effet, au bout d'une minute déjà, plus de 90 % des phages sont inhibés, ce qui rend inutile l'emploi du chloroforme, car à ce moment-là, la stérilisation des mycobactéries est loin d'être achevée ; malgré les pertes qu'elle provoque, la filtration sur bougie Chamberland L3 est préférable, car le rendement est meilleur et la filtration élimine une grande partie des débris bactériens qui se trouvent dans le lysat.

C. Influence du Tween 80.

La recherche de l'action des mycobactériophages sur les bacilles tuberculeux pose un certain nombre de problèmes. La culture de ces germes est lente sur la plupart des milieux, et le milieu de Löwenstein, plus favorable, possède un certain pouvoir inhibiteur de la lyse. Le milieu de Dubos [**44**] est un milieu de choix pour la culture de ces bacilles, et tout naturellement, on a cherché à l'employer pour l'étude des mycophages. Malheureusement, ce milieu ne convient pas, car la lyse ne peut pas s'y produire. Ce fait a été signalé à plusieurs reprises [**19**] [**45**] [**46**]. White et Knight [**45**] ont montré que l'empêchement de la lyse est dû au Tween 80, un des constituants du milieu de Dubos. En effet, la lyse se produit très bien dans le milieu de Dubos sans Tween, mais l'avantage principal de ce milieu, la rapidité de culture, est perdu si le Tween fait défaut. Des observations analogues avaient été faites précédemment par Groman et Bobb [**65**] et par Bobb et Groman [**66**] sur l'action inhibitrice du Tween sur la lyse des bacilles diphtériques. Ces deux auteurs ont pu montrer que le Tween empêche la fixation du phage sur les bactéries, mais qu'il est sans effet sur la lyse des bactéries déjà infectées.

Alors que le Tween n'a pas d'action sur la lyse des entérobactéries, même à des doses beaucoup plus élevées que celles qui sont utilisées dans le milieu de Dubos, il semble que ce composé empêche la fixation sur les bactéries de tous les mycobactériophages.

Nous nous sommes assuré que tel est bien le cas pour le phage « Cossonay ». En milieu liquide, l'effet est particulièrement visible. A la concentration de 0,01 %, la lyse des mycobactéries saprophytes ne peut pas se faire, que ce soit dans le milieu de Dubos habituel ou dans du bouillon contenant cette même concentration de Tween.

En milieu solide, on peut voir que l'action du Tween ne s'exerce pas sur tous les phages. Par exemple, si on incorpore 0,01 % de Tween à la gélose molle servant à la titration, on note que 10 % environ des phages peuvent encore donner naissance à des plages.

Au point de vue pratique, cela signifie que le milieu de Dubos ne peut pas être employé pour l'étude des mycobactériophages, et que d'autres milieux doivent être utilisés.

d) **Propriétés biologiques du bactériophage « Cossonay ».**

Lors des premières titrations du phage « Cossonay », nous avons remarqué des écarts importants entre les résultats obtenus, suivant que l'une ou l'autre des 4 souches sensibles 172, 521, 908 ou 909 étaient utilisées (p. 37). Nous allons examiner un certain nombre de possibilités d'expliquer ces anomalies.

Nous avons déjà dit, au début de cette étude, que si, pratiquement, une plage a comme origine un seul phage, il est rare que chaque phage donne naissance à une plage visible. Aussi, lorsqu'on effectue un titrage, on ne compte pas les particules de phage, mais bien les *centres infectieux,* qui sont moins nombreux. Du reste, il convient de rappeler qu'une plage peut être produite aussi bien par un phage libre infectant une bactérie après l'ensemencement que par une bactérie déjà infectée pour une raison ou pour une autre.

Pour qu'une plage se forme, il faut qu'un phage se fixe sur une bactérie sensible. Or les phages peuvent, dans certains cas, se fixer sur des bactéries mortes aussi bien que sur des bactéries vivantes. Mais il est évident que si un phage se fixe sur une bactérie morte, il ne se formera aucune plage, puisque la multiplication du phage ne se produit qu'avec des bactéries en voie de croissance. C'est la raison pour laquelle on doit toujours employer des cultures jeunes quand on désire effectuer des titrations, car les cultures jeunes ne renferment qu'une proportion négligeable de bactéries mortes.

Comme nous avons toujours utilisé des cultures jeunes au cours de nos essais, cette explication ne doit pas être retenue.

D'autres facteurs peuvent encore intervenir. Supposons, par exemple, qu'on fasse une titration au moyen d'un bactériophage dilué et d'une souche sensible. Si le nombre des bactériophages est petit par rapport au nombre des bactéries, il n'y a qu'une probabilité très faible que plusieurs phages se fixent sur la même bactérie, ce qui fausserait le résultat final, puisqu'une bactérie ne donne qu'une seule plage, qu'elle soit infectée par un ou par plusieurs bactériophages. La probabilité d'une infection multiple est donc si petite que l'erreur qui pourrait en résulter est négligeable, d'autant plus qu'elle est beaucoup plus petite que d'autres erreurs sur lesquelles nous reviendrons.

Par contre, si le nombre de bactéries est du même ordre de grandeur que celui des bactériophages, l'erreur peut être considérable. Mais, dans nos essais, nous avons toujours employé des suspensions suffisamment concentrées pour les titrations. Cette cause d'erreur ne saurait donc expliquer les anomalies observées.

D'autre part, la qualité de la suspension bactérienne intervient d'une façon non négligeable dans le résultat final de la titration. La démonstra-

tion a été faite par NICOLLE [**67**] à propos d'autres bactéries, mais les conclusions de cet auteur sont applicables également aux mycobactéries. L'étude en question remontant à 1943, époque à laquelle aucun mycobactériophage n'était connu, il est naturel que son auteur n'ait pas fait mention des mycobactéries. Voici en peu de mots de quoi il s'agit.

Alors que la plupart des bactéries (les entérobactéries en particulier) donnent des cultures parfaitement homogènes en milieu liquide, et dont l'examen microscopique montre que les éléments bactériens sont nettement séparés les uns des autres, certaines espèces, comme par exemple les staphylocoques, les streptocoques, les *Subtilis*, les mycobactéries, poussent soit en amas, soit en chaînettes, soit en voiles, que les agitations les plus prolongées ne peuvent rompre que difficilement. Les grumeaux qui subsistent après un tel traitement sont formés d'un grand nombre d'éléments bactériens, souvent des centaines, parfois des milliers. Il est dès lors facile de comprendre qu'un de ces grumeaux peut fixer plusieurs bactériophages, quand une telle souche est employée pour faire une titration. Mais, si nombreux que soient les phages fixés par ces grumeaux, il ne se formera qu'une seule plage à l'endroit où ils se trouvent. On conçoit que l'erreur dans la titration puisse être très grande, suivant le nombre et l'importance des grumeaux.

Les mycobactéries, on le sait, poussent généralement en voiles difficiles à briser. Nous avons signalé, au début de ce travail, le moyen que nous avons employé pour obtenir des suspensions homogènes de bactéries. Mais les perles de verre et une agitation prolongée ne suffisent pas à séparer tous les bacilles les uns des autres.

Nicolle propose l'artifice suivant : l'étalement doit être fait en deux temps (il s'agit ici de la technique d'étalement de d'Hérelle et non de celle de Gratia). Dans un premier temps, on étale la dilution de phage au moyen d'un étaleur de verre. Les phages se fixent rapidement sur la gélose, et sont répartis uniformément. Au bout de quelques minutes, on ajoute l'émulsion de bactéries. Même si cette émulsion contient des grumeaux, l'inconvénient que nous avons signalé plus haut ne se produira pas, car les phages, déjà fixés à un endroit déterminé de la gélose, n'entreront en contact qu'avec une bactérie très proche ; si les grumeaux ne sont pas trop nombreux, il n'y a pratiquement pas de chances qu'ils fixent plus d'un phage chacun. Des études quantitatives ont montré l'exactitude de cette supposition.

Malgré sa précision incontestable, la méthode proposée par Nicolle a deux inconvénients. D'une part elle empêche l'emploi de la technique de Gratia, dont nous avons déjà signalé les avantages, et qui ne peut se faire en deux temps. D'autre part, la préparation de la titration est beaucoup plus longue. Comme il est parfois nécessaire de faire un grand nombre de titrations dans la même journée, on comprend que cet aspect de la question doive entrer en considération.

Nous avons essayé de trouver une autre méthode capable d'éliminer les erreurs dues aux grumeaux des cultures bactériennes. Il suffit de centrifuger à faible vitesse pendant une minute les cultures homogé-

néisées auparavant par agitation avec des perles. La vitesse nécessaire à la centrifugation ne peut pas être donnée avec précision, car elle dépend essentiellement du poids des grumeaux à éliminer. On se rend compte facilement *de visu* de la vitesse qui convient à chaque échantillon. On arrive, par ce moyen, à débarrasser une culture bactérienne des plus grosses particules, ce qui permet d'obtenir des résultats plus précis lors des titrations.

Si cette méthode est longue, elle offre du moins l'avantage de permettre l'emploi de la technique de Gratia. Les résultats sont plus réguliers qu'avec les cultures non centrifugées.

Pratiquement, quand on ne désire pas une très grande précision dans les résultats, précision qu'il est du reste difficile d'obtenir, on peut se contenter de laisser reposer la culture pendant une demi-heure, après l'avoir agitée. Les grumeaux se sédimentent, et on prélève dans le haut du tube les échantillons pour les titrages.

Il est donc démontré que la présence de grumeaux peut modifier dans une mesure importante le résultat des titrations. Mais ce phénomène ne suffit pas à lui seul à expliquer les différences considérables rencontrées d'une souche à l'autre (par exemple entre les souches 908 et 909, déjà citées). Du reste, les chiffres les plus bas sont obtenus avec des souches donnant relativement peu de grumeaux. Il doit donc y avoir une autre cause aux différences de titre que nous avons observées.

Ellis et Delbrück, en 1938 [**68**], montrent que si le nombre de plages obtenues avec un phage et une souche de bactéries sensibles est proportionnel à la concentration, il n'est pas égal à cette concentration. Le nombre des plages est toujours inférieur à celui des particules de phage, dans une proportion variable suivant les conditions.

Une méthode biologique a permis à ces auteurs d'affirmer que, pour le phage étudié, 4 phages sur 10 donnaient des plages. Il s'agissait évidemment d'une souche pure de bactériophage. Ellis et Delbrück ont donné le nom d'« efficacité d'étalement » (efficiency of plating) au rapport entre le titre mesuré et le titre réel.

Une méthode permettant de compter le nombre des phages présents dans un milieu, et de compter non seulement les particules infectantes, mais aussi les autres, a été décrite par Luria, Williams et Backus [**69**]. Le bactériophage est mélangé dans une proportion connue à une suspension de particules de latex de polystyrène dont la concentration a été déterminée avec précision. Une partie de ce mélange est examinée au microscope électronique, après avoir été étalée sur un porte-objet spécial. On compte alors d'une part les phages, reconnaissables à leur morphologie particulière, et d'autre part les particules de latex, parfaitement sphériques, dans un certain nombre de champs microscopiques. Un calcul simple, dans lequel interviennent le nombre des phages et le nombre des particules de latex comptés au microscope électronique, de même que la concentration initiale des particules de latex, le volume de phage et le volume de la suspension de latex utilisée, donne, avec une précision

dépendant de différents facteurs, le nombre de phages se trouvant dans la suspension de titre inconnu.

On appelle *efficacité d'étalement absolue* le rapport entre le titre trouvé avec une souche donnée par une méthode biologique (Gratia par exemple) et le titre réel, trouvé par exemple par la méthode de Luria, Williams et Backus, tandis que l'*efficacité d'étalement relative* est le rapport entre le titre trouvé par une méthode biologique avec une souche donnée et le titre trouvé, par la même méthode, avec une autre souche, généralement celle qui montre le plus haut titre avec le phage donné. L'efficacité d'étalement relative est toujours plus haute que l'efficacité d'étalement absolue.

Pour une souche bactérienne déterminée, l'efficacité d'étalement semble indépendante du nombre de bactéries servant à la titration (pour autant que ce nombre ne varie pas dans des limites trop éloignées), indépendante de la température de la culture et de la concentration du milieu en gélose.

Il faut donc conclure que toutes les bactéries infectées par un phage ne sont pas capables de donner naissance à une plage visible. La preuve a été faite en effet que l'adsorption du phage (facilement mesurable par des méthodes biologiques) se fait normalement, mais que la lyse, par contre, n'a pas lieu pour toutes les bactéries ayant fixé un phage.

Ces observations ne sont valables que lorsqu'on emploie, comme souche sensible, la souche ayant servi à préparer le phage. C'est dans ce cas que l'efficacité d'étalement est la plus élevée. Mais quand on utilise des souches différentes, on peut avoir une efficacité d'étalement considérablement plus faible. De très nombreux exemples, qu'il est impossible de citer, ont été donnés à l'appui de cette règle.

Les écarts constatés dans nos premiers essais proviennent donc, semble-t-il, d'une différence d'efficacité d'étalement entre les souches.

Outre celles que nous avons données, il existe encore d'autres explications possibles aux différences que l'on constate entre les titres obtenus avec diverses souches bactériennes.

Pour les souches avec lesquelles l'efficacité d'étalement est faible, on peut supposer qu'il est nécessaire que plusieurs phages se fixent sur la même bactérie pour provoquer la lyse. Le fait que les chances d'une infection multiple sont beaucoup plus rares que celles d'une infection unique pourrait expliquer le petit nombre de plages qui se forment. Luria [**70**] a démontré mathématiquement que cette hypothèse est erronée. En effet, si deux particules de phage étaient nécessaires pour provoquer la lyse d'une seule bactérie, « la probabilité de l'infection double (et par conséquent le nombre de plages) devrait augmenter avec le carré du facteur de concentration, ce qui ne correspond pas aux faits expérimentaux ». Luria rejette de la même façon l'hypothèse de la nécessité de plus de deux phages par bactérie.

Luria parlait des souches sur lesquelles il avait expérimenté, et il est évident que l'hypothèse de la nécessité d'une infection multiple ne doit pas être rejetée purement et simplement. Mais, dans les exemples que

nous avons donnés à propos du bactériophage « Cossonay » et de quatre souches sensibles, le nombre de plages était toujours proportionnel à la concentration, et les conclusions de Luria y sont applicables.

Il reste encore deux possibilités d'explication aux anomalies que nous avons signalées ; ces possibilités ont également été avancées par certains auteurs qui avaient constaté des anomalies semblables pour d'autres bactéries et d'autres bactériophages. Nous allons examiner ces deux possibilités l'une après l'autre.

A. Hypothèse d'un mélange de germes.

On peut émettre l'hypothèse que les souches de bactéries employées pour les titrations ne sont pas homogènes. Gratia, en 1921 [**71**], à une époque où la nature du bactériophage, récemment découvert par d'Hérelle, donnait encore lieu à toutes sortes de controverses, formula cette hypothèse pour montrer que, contrairement à la conviction de d'Hérelle, le bactériophage pouvait fort bien être un principe diffusible et non pas un être organisé. Son explication était la suivante.

Les souches dites sensibles sont en réalité formées d'éléments résistants et d'éléments sensibles en proportions variables (Gratia avait du reste réussi, dans le cas d'une souche de colibacilles, à obtenir séparément les deux variétés d'individus [**72**]). L'adjonction de bactériophage dilué à une telle souche provoquait bien la formation de plages, dont Gratia expliquait la présence en disant qu'à l'origine de chaque plage se trouvait un colibacille sensible qui devenait alors un « centre de régénération du principe lytique ». L'auteur donnait encore une explication concernant la variation du nombre de plages avec la concentration. Il suffisait pour cela de supposer qu'il n'existe pas seulement des bactéries sensibles et des bactéries résistantes, mais qu'on trouve encore tous les intermédiaires. Ainsi, à chaque dilution de phage correspondrait une certaine quantité de bactéries susceptibles d'être lysées. Sans rejeter complètement l'idée que le bactériophage pouvait être un parasite, Gratia pensait qu'il pouvait tout aussi bien s'agir d'un principe diffusible.

Si de nouvelles expériences devaient montrer que cette dernière hypothèse était erronée, les observations qui l'avaient suggérée méritent qu'on s'y arrête encore.

La notion de mélanges de germes, déjà formulée par certains auteurs, et en particulier par Gratia dans le travail que nous venons de citer, a pris de l'importance depuis quelques années. De nombreux travaux ont été publiés à ce sujet à l'Institut de Bactériologie et d'Hygiène de Lausanne par le Prof. Hauduroy [**73**] et par quelques-uns de ses collaborateurs. Ces travaux sont des exemples frappants de ces mélanges de germes, qui semblent être beaucoup plus fréquents qu'on ne serait tenté de le supposer. C'est grâce au « séparateur de germes » mis au point par le Prof. Hauduroy [**74**] [**75**] que de telles démonstrations ont été rendues possibles.

Le « séparateur de germes » est un appareil qui permet d'obtenir un aérosol à partir de n'importe quelle culture bactérienne en milieu liquide. L'aérosol, produit de la manière habituelle grâce à de l'air comprimé fourni par une poire

de caoutchouc, passe à travers un système de chicanes qui retiennent les grosses gouttelettes. Il arrive ensuite dans une sorte d'entonnoir renversé sous lequel est placée une boîte de Petri contenant un milieu de culture solide favorable. Les fines gouttelettes qui ont passé à travers les chicanes ne contiennent en principe qu'un seul germe ; les colonies qui vont pousser à la surface du milieu de culture ensemencé au moyen de cet aérosol seront donc formées chacune d'éléments tous semblables, nés d'une cellule unique.

Cette technique présente un avantage immense sur le micromanipulateur, qui permet d'arriver au même résultat, mais au prix de manœuvres beaucoup plus compliquées et considérablement plus longues.

L'hétérogénéité des souches de mycobactéries a pu, grâce au séparateur de germes, être démontrée à plusieurs reprises [**76**] [**77**] [**78**], cette hétérogénéité concernant le pouvoir pathogène, la pigmentation, la sensibilité aux antibiotiques, etc.

Nous nous sommes demandé si certaines souches de mycobactéries ne sont pas également hétérogènes dans leur comportement vis-à-vis du bactériophage, comme Gratia le supposait pour d'autres germes. L'utilisation du séparateur de germes facilite la vérification de cette hypothèse.

Si l'hétérogénéité des mycobactéries est la seule responsable des différences d'efficacité d'étalement observées d'une souche à l'autre, nous pouvons prévoir le résultat des essais.

Prenons, par exemple, une souche B qui, titrée avec le même phage qui a été titré au préalable sur une souche A, donne 1000 fois moins de plages. Cela veut dire, toujours dans le cas où notre hypothèse est juste, qu'une bactérie B seulement sur 1000 est sensible à l'action du phage, ou, tout au moins, est capable de donner naissance à une plage visible, tandis que les 999 autres ne donnent pas de plages visibles.

Si les deux variétés sont mélangées d'une façon homogène, il y a une chance sur 1000 pour qu'un phage se fixe sur une bactérie sensible et puisse se multiplier, donnant naissance à une plage. La plage qui se forme dans de telles conditions est évidemment riche en cultures secondaires, puisque les phages produits par la lyse de la bactérie sensible sont incapables de lyser les bactéries résistantes (il ne s'agit pas en fait de vraies cultures secondaires, car les bactéries qui poussent sont résistantes avant l'action du phage).

Si, au moyen du séparateur de germes, on ensemence cette souche B et qu'on repique 1000 colonies, on doit théoriquement obtenir une seule « filière » sensible et 999 résistantes, la filière sensible devant, toujours au point de vue théorique, donner autant de plages que la souche A, puisque formée exclusivement d'éléments sensibles.

En pratique, il est bien entendu impossible de trouver exactement cette proportion. On n'obtiendra peut-être aucune souche sensible ; il est possible aussi qu'on en trouve 5 ou 10 ; là n'est pas l'important. Le but principal de l'expérience est de prouver qu'il existe, avant toute action du bactériophage, des éléments complètement résistants en très forte majorité.

1) *Essais avec la souche 908.*

Nos premiers essais ont porté sur la souche 908 qui, comme nous l'avons indiqué, révèle une efficacité d'étalement relativement basse ; le phage « Cossonay » titré sur cette souche donne environ 100 fois moins de plages que s'il est titré sur la souche 909. Si l'hypothèse que nous avons formulée plus haut est exacte, il doit donc se trouver, dans la souche 908 totale, 99 % d'éléments résistants et 1 % seulement d'éléments sensibles.

Une culture en bouillon de la souche 908, âgée de 48 heures et bien homogénéisée par agitation avec des perles de verre est introduite dans le séparateur de germes, puis ensemencée au moyen de cet appareil sur des boîtes de Petri contenant du milieu de Löwenstein. L'ensemencement étant monobacillaire, il faut 8 à 10 jours pour obtenir des colonies suffisamment grosses. Au bout de ce laps de temps, 100 colonies sont repiquées dans des tubes de bouillon contenant des perles de verre. Les colonies ayant pratiquement toutes le même diamètre et étant ensemencées dans leur totalité, les 100 cultures poussent à la même vitesse et, en 48 heures, tous les tubes contiennent une culture de même intensité. Les tubes sont agités, et on essaie, sur chacune des filières obtenues, la même préparation de bactériophage « Cossonay », titrée auparavant sur la souche 908 totale, et diluée de façon à obtenir une centaine de plages par boîte.

Résultats.

Nous donnons, dans le tableau qui suit, les résultats obtenus.

Tableau 4
Titres obtenus avec 100 filières différentes de la souche 908

Filière N°	*Titre*	*Filière N°*	*Titre*
908/1	45	908/20	800
908/2	365	908/21	165
908/3	1180	908/22	425
908/4	375	908/23	1510
908/5	590	908/24	135
908/6	> 25000	908/25	75
908/7	1815	908/26	495
908/8	480	908/27	535
908/9	1230	908/28	260
908/10	770	908/29	270
908/11	565	908/30	285
908/12	510	908/31	500
908/13	505	908/32	1485
908/14	500	908/33	760
908/15	480	908/34	520
908/16	1015	908/35	230
908/17	150	908/36	410
908/18	445	908/37	555
908/19	960	908/38	390

Filière N°	*Titre*	*Filière N°*	*Titre*
908/39	445	908/70	650
908/40	1000	908/71	710
908/41	1005	908/72	725
908/42	660	908/73	760
908/43	560	908/74	650
908/44	375	908/75	580
908/45	2665	908/76	480
908/46	> 25000	908/77	765
908/47	450	908/78	> 25000
908/48	300	908/79	680
908/49	450	908/80	415
908/50	520	908/81	430
908/51	530	908/82	290
908/52	285	908/83	125
908/53	375	908/84	400
908/54	1000	908/85	530
908/55	305	908/86	1010
908/56	300	908/87	340
908/57	325	908/88	325
908/58	385	908/89	1085
908/59	340	908/90	1000
908/60	265	908/91	480
908/61	515	908/92	445
908/62	800	908/93	390
908/63	415	908/94	1230
908/64	720	908/95	280
908/65	680	908/96	510
908/66	865	908/97	595
908/67	1310	908/98	380
908/68	465	908/99	505
908/69	575	908/100	1100

Remarques : les filières 908/6, 908/46 et 908/78 ont donné, lors des premiers essais, des lyses confluentes avec des cultures secondaires très abondantes. De nouvelles titrations ont été faites avec ces filières et du phage dilué 10 fois. Dans les trois cas, nous avons obtenu des plages, toutes très fortement obscurcies par des cultures secondaires. Il a été de ce fait très difficile de les compter avec précision, car il était presque impossible de les voir. Nous avons estimé leur nombre à environ 500 par plaque, sinon davantage, ce qui donne un titre de plus de 25000.

D'autre part, les filières 908/40, 908/54 et 908/90 ont également donné des plages avec d'abondantes cultures secondaires, mais cette fois avec le phage non dilué. Nous avons estimé leur nombre à 200 par boîte, ce qui correspond à un titre de 1000.

Discussion.

Avant d'examiner les résultats donnés par le tableau ci-dessus, il convient de dire quelques mots au sujet du diamètre des plages obtenues

avec les différentes filières. Dans la plupart des cas, les plages avaient un diamètre de 0,1 à 0,5 mm, comme pour la souche totale. Mais dans 22 cas sur 100, certaines plages ont atteint et même dépassé 1 mm de diamètre, et, chose intéressante, de tels diamètres n'ont été notés que pour des filières ayant plus de 100 plages par boîte (titre supérieur à 500). Nous aurons l'occasion de reparler du diamètre des plages dans une autre partie de cette étude, mais nous pouvons déjà tirer quelques conclusions de ces observations.

Les dimensions des plages dépendent de nombreux facteurs. Laissons de côté l'influence du milieu de culture que nous avons déjà signalée, et qui ne peut pas être la cause des variations que nous avons observées, puisque, dans tous les cas, nous avons employé le même milieu et la même technique de titration.

Elford et Andrewes [**79**] ont trouvé que le diamètre des plages était inversément proportionnel à la dimension des bactériophages. Si tel était le cas dans l'expérience que nous relatons, il faudrait conclure que les bactériophages ont des dimensions différentes d'un essai à l'autre. Il s'agirait alors d'un mélange de bactériophages, hypothèse qui ne doit pas être exclue *a priori*. Nous discuterons cette éventualité dans une autre partie de ce travail.

Les autres facteurs influençant le diamètre des plages sont le nombre de phages libérés lors de la lyse d'une bactérie infectée, le temps de latence, la vitesse d'adsorption et la vitesse de diffusion. Or certains de ces facteurs dépendent non seulement du bactériophage, mais encore de la bactérie. Les différences de taille des plages que nous avons obtenues peuvent donc s'expliquer par une hétérogénéité de la souche 908, hétérogénéité qui est du reste confirmée par les chiffres très différents obtenus lors des titrations. On voit enfin que les filières 908/6, 908/40, 908/46, 908/54, 908/78 et 908/90 ont d'abondantes cultures secondaires dans leurs plages, ce qui n'est pas le cas pour les autres filières.

Si l'on compare les chiffres obtenus avec les 100 filières de la souche 908, on constate de grandes différences. Le titre le plus bas est de 45, et le titre le plus haut est supérieur à 25000, ce qui est considérable. Il convient de rappeler le titre obtenu avec le même phage et la souche 908 totale : 625 plages/cc.

Quelle précision peut-on attendre des résultats des titrations ? A part les 6 cas que nous avons déjà mentionnés, où les cultures secondaires masquaient la plupart des plages, et où la numération était pratiquement impossible, nous pouvons garantir une excellente précision du comptage des plages visibles à l'œil nu.

L'emploi de l'appareil à compter exclut les erreurs d'addition. Cependant, dans toute opération quantitative en biologie, il faut s'attendre à une certaine quantité d'erreurs. Quelles sont-elles pour l'opération de titration ? Comme nous sommes parti, pour tous les essais de cette série, de la même dilution de phage, nous pouvons éliminer d'emblée l'erreur due à la dilution du phage, qui n'intervient pas dans les écarts que nous avons observés. A notre avis, l'erreur de mesure du volume du phage

ajouté à la gélose molle ne dépasse pas 2 %. Lors de l'étalement de cette gélose molle sur la couche de base, il reste évidemment un peu de milieu dans le fond du tube de gélose molle ; là encore, l'erreur ne doit pas dépasser 2 %, et elle intervient d'une façon négligeable si on ne considère pas le résultat absolu des titrations, mais le résultat relatif ; en effet, la quantité de gélose molle restant fixée au fond et aux parois du tube est pratiquement la même pour chaque essai.

Nous avons signalé l'importance de la présence des grumeaux dans les suspensions microbiennes utilisées. L'erreur qui peut en résulter est certainement assez grande, car le nombre et le volume de ces grumeaux varient d'une filière à l'autre.

En tenant compte de ces différentes sources d'erreur, et en prenant une marge de sécurité suffisante, nous pouvons admettre que l'erreur totale ne doit pas dépasser 20 %.

Si nous examinons maintenant les résultats portés dans le tableau 4, nous voyons que notre hypothèse de départ ne s'est pas vérifiée. En effet, aucune des 100 filières n'est totalement résistante au phage, alors que, si l'hypothèse avait été juste, il aurait dû s'en trouver 99.

Devant la grande diversité des résultats obtenus, nous avons voulu refaire quelques essais à titre de vérification. Nous avons refait les titrations avec les filières 908/6, 908/46 et 908/78 qui, on le sait, avaient donné des résultats beaucoup plus élevés que les autres filières. Ces nouveaux essais ont confirmé les premiers.

La souche 908 est donc hétérogène dans son comportement vis-à-vis du phage « Cossonay », mais pas dans le sens supposé au début. Les différences entre les filières ne sont pas nettement tranchées, mais, au contraire, il semble qu'il y ait une variation presque continue de la sensibilité au phage. Rappelons que Gratia pensait précisément qu'il en était ainsi. L'efficacité d'étalement est donc variable d'une filière à l'autre, et l'efficacité d'étalement de la souche totale est la moyenne des efficacités d'étalement des filières. Si la moyenne des titres obtenus avec les 100 filières est supérieure au titre de la souche totale, c'est que nos prélèvements de colonies n'ont pas été faits suivant les lois du hasard. Tout d'abord les colonies poussant sur le milieu de Löwenstein après séparation ne sont probablement pas le reflet exact de ce qu'il y a dans une culture totale en milieu liquide. Nous avons montré l'hétérogénéité de la souche 908 dans sa sensibilité au phage. Mais cette hétérogénéité se manifeste aussi peut-être par des différences de vitesse de croissance, de facilité à passer à travers le séparateur de germes, etc. Enfin, nous n'avons prélevé que 100 colonies, ce qui est nettement insuffisant pour une statistique. Mais notre but était simplement de voir si la souche était hétérogène ou non.

Or, ainsi que nous l'avons montré, la souche 908 est hétérogène. Plusieurs filières semblent pourtant être identiques (en tenant compte de la marge d'erreur de $\pm$ 20 %), comme par exemple 908/6, 908/46 et 908/78. D'autre part, on compte 24 filières ayant le même titre que la souche totale. Nous remarquons aussi que les filières ayant le titre le plus élevé

ont un titre encore légèrement plus bas que celui qu'on obtient avec la souche 909, par exemple. Mais il est possible qu'il existe dans la souche 908 une filière qui donnerait le même titre que la souche 909. Si cette filière hypothétique ne se trouve que dans une très faible proportion dans la souche totale, il est compréhensible que nous ne l'ayons pas isolée en ne repiquant que 100 colonies.

Pour quelle raison les filières de la souche 908 ont-elles des sensibilités différentes au phage « Cossonay » ? Nous avons signalé que le diamètre des plages semblait, dans cette expérience, lié à leur nombre, les titres élevés étant obtenus avec des filières formant de grandes plages. Formulons l'hypothèse suivante : les filières de la souche 908 ont toutes une sensibilité identique au bactériophage « Cossonay », mais la lyse se fait à des vitesses différentes pour chacune des filières.

Le diamètre des plages dépend non seulement de la vitesse du processus de la lyse et de celle de la croissance des bactéries, mais encore du moment où se fait l'infection. Plus l'infection est tardive, plus la plage est petite. Or il s'en faut de beaucoup que toutes les bactéries s'infectent en même temps. C'est pourquoi on observe généralement des plages de grandeurs différentes sur la même plaque. Suivant la souche bactérienne, ces variations de grandeur sont importantes ou pas. Dans le cas des souches formant de très petites plages, il est permis de supposer que certaines d'entre elles échappent à l'observation. L'examen microscopique des cultures sur plaques confirme cette supposition. A un grossissement de 100 fois, on observe parfois des zones claires rondes dont la morphologie rappelle celle des plages. Ces « microplages », provenant sans doute d'infections tardives, ne peuvent évidemment pas être vues à l'œil nu. Il faudrait, pour les compter, observer toute la plaque au microscope, ce qui est pratiquement impossible.

Un séjour prolongé à l'étuve ne sert à rien et aucune plage nouvelle ne devient visible à l'œil nu. Au contraire, les cultures secondaires prennent de l'importance et peuvent masquer complètement des plages qu'on voyait facilement avant. L'augmentation du diamètre d'une plage s'arrête, rappelons-le, quand la croissance des bactéries sensibles s'arrête elle-même, généralement à cause de l'épuisement du milieu de culture ou de l'accumulation des produits du métabolisme. Il faut donc être conscient qu'en faisant une numération de plages, on ne peut pas les compter toutes ; cette erreur est d'autant plus grande que les plages sont plus petites.

Selon notre hypothèse, la vitesse de la lyse est variable d'une filière à l'autre. Les diamètres des plages sont par conséquent également différents ; le nombre des plages invisibles devrait dans ce cas varier aussi d'une filière à l'autre, ce qui expliquerait la diversité des titres.

L'hypothèse que nous avons formulée est donc acceptable, mais il est difficile de déterminer avec précision si deux phénomènes ne sont pas superposés : différence de la vitesse de la lyse et différence de sensibilité. Comme il n'existe pas de moyen d'augmenter le diamètre des microplages pour qu'elles deviennent visibles à l'œil nu, il est pratique-

ment impossible de déterminer le titre exact sur chaque filière et, par conséquent, de trancher la question.

Il existe pourtant un moyen de n'obtenir que des grandes plages de diamètre très constant. Il suffit pour cela de mélanger bactériophage et bactéries dans un tube, de les mettre à l'étuve pendant un certain temps pour permettre l'adsorption, puis de neutraliser les phages non encore fixés (qui sont, quand on emploie la technique habituelle, responsables des infections tardives) au moyen d'un antisérum préparé par injections répétées de phage à un lapin. On étale ensuite le mélange phage-bactéries-sérum sur une boîte de Petri selon la méthode de Gratia. Les plages obtenues ont un diamètre constant, mais il est impossible de déterminer le titre du phage, puisqu'une partie des particules a été inhibée par le sérum.

Dans le cas de la souche 908, si le titre atteint 25000 pour certaines filières, c'est que le phénomène de lyse est assez rapide pour que les plages, même celles qui ont pour point de départ une bactérie infectée tardivement, atteignent une taille suffisante pour être visibles à l'œil nu. Remarquons encore que les filières donnant 25000 plages au cc sont peut-être identiques, quant à leur sensibilité, à la souche 909, mais que, là encore, des infections tardives font que certaines plages restent invisibles à l'œil nu.

En conclusion de cette série d'essais, nous pouvons nous persuader de l'importance des mélanges de germes dans les résultats obtenus. En effet, si les filières ont de légères différences de vitesse de croissance, leurs proportions respectives dans la souche totale varient au cours du temps et les filières poussant rapidement seront plus abondantes dans les cultures âgées que dans les cultures jeunes, d'où la nécessité d'employer pour tous les essais des cultures du même âge. Pour notre part, nous avons, dans nos expériences, toujours employé des cultures âgées de 48 heures. La solution la plus élégante et la plus précise serait évidemment d'utiliser uniquement des cultures descendant d'une cellule unique. C'est la solution que nous avons adoptée dans tous les essais nécessitant une certaine précision. Mais il est évident que, dans ce cas, on risque de passer à côté de phénomènes intéressants, puisque, en choisissant une filière dans une souche, on laisse nécessairement de côté les autres filières douées de propriétés différentes.

Quelle est l'origine de l'hétérogénéité de la souche 908 ? Nous ne sommes pas, à propos de cette souche, dans des conditions analogues à celles qu'on rencontre dans l'étude de certaines mycobactéries isolées de produits pathologiques. Il est arrivé qu'on trouve, dans une même expectoration ou dans un même liquide de lavage gastrique, 2 ou même 3 souches de mycobactéries, isolables au moyen du séparateur de germes, et possédant des propriétés très différentes (pouvoir pathogène, pigmentation, vitesse de croissance). Dans de tels cas, il est facile de séparer les différentes filières, de les entretenir et de les conserver séparément. Il en va tout autrement lorsque les différences constatées d'une filière à l'autre varient d'une façon continue, comme c'est le cas dans l'expérience

que nous venons de relater. Combien existe-t-il de filières différentes ? Lesquelles sont-elles ? Nous avons admis une erreur de ± 20 %. En tenant compte de cette marge d'erreur, nous pouvons classer les 100 filières en un certain nombre de catégories, mais nous devons choisir le titre moyen de chaque catégorie d'une façon arbitraire et, suivant notre choix, une filière entrera dans l'une ou l'autre de ces catégories. Prenons par exemple les filières 908/3 et 908/9. Leurs titres (1180 et 1230) ne diffèrent que de peu (à peine 5 %), et il serait raisonnable de les considérer comme identiques. Mais si nous prenons 1000 comme titre moyen pour l'une des catégories, l'erreur de ± 20 % nous autorise à classer dans ce groupe toutes les filières ayant un titre compris entre 800 et 1200. La filière 908/3 sera dans ce groupe, mais pas la filière 908/9. Il est donc pratiquement impossible de déterminer le nombre exact des filières différentes.

Nous pouvons cependant considérer à coup sûr comme identiques les filières 908/6, 908/46 et 908/78. Elles doivent être les seules de leur groupe, puisque le titre immédiatement inférieur est celui de la filière 908/23, qui est plus de 10 fois plus petit.

Signalons pour terminer une étude due à Fredericq [**80**] [**81**]. Constatant des différences dans les titres du phage T. 1 (coliphage) suivant qu'ils étaient mesurés sur une souche de colibacilles ou sur d'autres, Fredericq s'est demandé si ces différences étaient dues à une hétérogénéité des phages ou à une hétérogénéité des souches bactériennes. Ayant montré que la première hypothèse ne pouvait se vérifier, il a fait des essais sur 6 « subcultures » de 2 souches différentes. Les titres trouvés variaient de 1 à 43,5 pour une des souches et de 1 à 34 pour l'autre (rappel : 1 à 500 environ pour notre souche 908). Mais Fredericq parle de subcultures sans indiquer le moyen qu'il a employé pour les obtenir. Il n'a probablement utilisé ni micromanipulateur ni séparateur des germes, et il a obtenu pourtant d'importantes différences, bien que ses essais ne portent que sur 6 subcultures de chaque souche.

2) *Essais avec la souche 909.*

Le phénomène que nous avons décrit ne semble donc pas être une exception. Pour nous en assurer, nous avons fait une autre série d'expériences, cette fois à partir de la souche 909, qui, rappelons-le, donne pour le bactériophage « Cossonay » un titre 100 fois plus haut que la souche 908.

Pour ces essais, dont nous avons limité le nombre à 36, nous avons employé une autre préparation de bactériophage « Cossonay » donnant, après dilution, 236 plages par boîte avec la souche 909 totale, ce qui correspond à un titre de 1180/cc.

Comme dans le cas précédent, les filières ont été obtenues par séparation de la souche totale au moyen du séparateur de germes sur une plaque de Löwenstein ; les colonies ont été repiquées en bouillon, et les cultures obtenues ont servi à faire les titrations. Le tableau 5 (page 58) donne les résultats que nous avons obtenus.

Tableau 5

Titres obtenus avec 36 filières différentes de la souche 909

Filière N°	*Titre*	*Filière N°*	*Titre*
909/1	760	909/19	740
909/2	1030	909/20	735
909/3	760	909/21	1010
909/4	810	909/22	1040
909/5	420	909/23	905
909/6	970	909/24	1020
909/7	940	909/25	705
909/8	1100	909/26	1340
909/9	950	909/27	—
909/10	1100	909/28	900
909/11	1270	909/29	985
909/12	1070	909/30	870
909/13	1140	909/31	1070
909/14	1160	909/32	1230
909/15	1060	909/33	—
909/16	980	909/34	1030
909/17	900	909/35	1400
909/18	810	909/36	990

Note : les filières 909/27 et 909/33 n'ont pas pu être titrées, car ces repiquages de colonies n'ont pas poussé en bouillon.

Discussion.

Nous voyons tout d'abord qu'aucune des filières étudiées n'est complètement résistante au phage. Les titres obtenus varient dans des limites plus étendues que ne l'autoriserait la marge d'erreur que nous avons admise. La variation des titres est de 1 à 3 environ, ce qui est considérablement plus bas que la variation observée à propos de la souche 908, et même passablement plus bas que la variation notée par Fredericq. Il est cependant possible que nous ayons passé à côté d'une filière qui aurait donné un titre plus haut ou plus bas que ceux que nous avons notés.

Si, comme pour la souche 908, nous attribuons la variété des titres à des différences de vitesse du phénomène de lyse, nous nous apercevons que la faible importance des variations du titre s'explique aisément. En effet, dans les 34 essais positifs, le diamètre des plages est particulièrement constant ; les plages ont en effet 2 mm de diamètre environ. Dans quelques plaques seulement, on peut noter de rares plages légèrement plus petites. On comprend que même les plages ayant pour origine une bactérie infectée tardivement soient visibles ; elles ont eu en effet le temps de croître suffisamment pour être visibles à l'œil nu. D'autre part, la souche ne donnant pas de cultures secondaires, aucune plage ne peut être masquée pour cette raison et échapper de ce fait à l'observation.

3) *Essais avec la souche 521.*

Une dernière série d'essais a été faite à partir de la souche 521.

Comme dans les deux séries d'expériences déjà rapportées, les filières ont été obtenues en repiquant des colonies obtenues par ensemencement de la souche totale au moyen du séparateur de germes. Au total, 100 filières ont été examinées. Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau suivant.

Tableau 6

Titres obtenus avec 100 filières différentes de la souche 521

Filière N°	*Titre*	*Filière N°*	*Titre*
521/1	655	521/37	675
521/2	605	521/38	425
521/3	695	521/39	1010
521/4	600	521/40	740
521/5	660	521/41	725
521/6	675	521/42	950
521/7	575	521/43	730
521/8	525	521/44	840
521/9	715	521/45	645
521/10	570	521/46	590
521/11	700	521/47	605
521/12	700	521/48	575
521/13	395	521/49	585
521/14	490	521/50	470
521/15	510	521/51	1010
521/16	610	521/52	1000
521/17	595	521/53	1100
521/18	925	521/54	830
521/19	535	521/55	710
521/20	595	521/56	955
521/21	435	521/57	855
521/22	425	521/58	1080
521/23	715	521/59	980
521/24	745	521/60	905
521/25	315	521/61	830
521/26	640	521/62	920
521/27	770	521/63	920
521/28	610	521/64	1040
521/29	730	521/65	865
521/30	330	521/66	1010
521/31	545	521/67	1030
521/32	595	521/68	830
521/33	620	521/69	950
521/34	650	521/70	1100
521/35	615	521/71	900
521/36	740	521/72	1030

Filière N°	*Titre*	*Filière N°*	*Titre*
521/73	695	521/87	895
521/74	605	521/88	790
521/75	935	521/89	725
521/76	930	521/90	965
521/77	1010	521/91	805
521/78	970	521/92	880
521/79	960	521/93	750
521/80	1030	521/94	1020
521/81	820	521 95	870
521/82	930	521/96	920
521/83	915	521/97	920
521/84	925	521/98	850
521/85	820	521/99	1010
521/86	965	521/100	1230

Note : Les essais 521/1 à 521/50 ont été faits au moyen de bactériophage provenant d'une certaine ampoule, tandis que les essais 521/51 à 521/100 ont été faits avec du phage provenant d'une autre ampoule. Ces deux ampoules, remplies avec la même préparation de phage et conservées de la même façon, contenaient, au moment de l'emploi, du bactériophage ayant un titre différent d'une ampoule à l'autre. Les résultats absolus n'ont du reste pas d'intérêt direct. Les titres relatifs sont plus importants, et nous considérerons cette expérience comme deux séries d'essais faites chacune avec 50 filières.

Discussion.

Comme dans les expériences conduites avec des filières des souches 908 et 909, nous remarquons qu'aucune filière n'est complètement résistante à l'action du bactériophage « Cossonay ». En outre, les variations de titre sont moins importantes (série 521/1 à 521/50 : 1 à 3 environ ; série 521/51 à 521/100 : 1 à 1,8). Ces variations, si peu importantes qu'elles soient, sont cependant supérieures à celles qu'on peut attribuer à l'erreur, que nous avons estimée à ± 20 %. La souche 521 est donc hétérogène dans son comportement vis-à-vis du bactériophage « Cossonay », et il est possible qu'elle le soit également vis-à-vis d'autres mycobactériophages, ce qui peut avoir une certaine importance. En effet, cette souche est employée à peu près dans tous les laboratoires étudiant les mycophages, dont la plupart l'attaquent avec facilité.

Il est donc des plus importants d'utiliser, au cours de l'étude d'un phage, une souche dont tous les individus descendent de la même cellule. La souche 521 étant très pratique à cause de sa grande sensibilité au phage « Cossonay » et de sa rapidité de culture, nous avons été amené à l'utiliser souvent. Par crainte d'avoir des résultats peu précis, nous avons choisi la filière 521/57, sans raison particulière, et nous l'avons employée de préférence à la souche 521 totale.

L'hétérogénéité de la souche 521 peut, comme dans les deux cas précédents, s'expliquer par des différences de vitesse dans le processus de

la lyse, et par le fait que les bactéries infectées tardivement ne donnent pas de plages visibles à l'œil nu.

Le diamètre des plages varie beaucoup d'une filière à l'autre. Pour une même filière, les diamètres sont aussi variables. Dans la plupart des plaques, on trouve en effet une certaine quantité de très petites plages (0,1 à 0,5 mm), tandis que la majorité des plages sont grandes, parfaitement visibles à l'œil nu (1 à 5 mm). Cette diversité des diamètres, ainsi que la présence de petites plages, semblent donner raison à notre hypothèse.

B. **Hypothèse d'un mélange de bactériophages.**

Le fait d'avoir démontré l'hétérogénéité, à des degrés divers, de trois souches de mycobactéries, ne doit pas exclure la possibilité d'un mélange de bactériophages, autrement dit d'une hétérogénéité de la souche « Cossonay ». Il n'y aurait en effet rien d'étonnant que les deux phénomènes soient superposés.

Les titres donnés pour le phage « Cossonay » par les souches 909 et 521 sont, rappelons-le, presque les mêmes, tandis que ce bactériophage donne 100 fois moins de plages s'il est titré sur la souche 908.

Supposons que le phage « Cossonay » soit en réalité un mélange de deux bactériophages A et B. Si d'une part le phage A attaque les souches 909 et 521, mais pas la souche 908, et que le phage B attaque la souche 908 (et éventuellement aussi les souches 909 et 521, ou l'une de ces deux seulement), et si d'autre part le phage « Cossonay » contient 100 fois plus de phages du type A que de phages du type B, les anomalies observées lors des titrations du phage « Cossonay » avec les souches 521, 908 et 909 deviennent facilement explicables. En effet, si l'on titre le mélange de phages avec ces trois souches, on obtiendra 100 fois moins de plages sur la souche 908 que sur les deux autres, puisqu'un phage seulement sur 100 sera capable de lyser cette souche 908.

Il reste donc à prouver que le phage « Cossonay » est bien un mélange, puis à obtenir les filières séparément afin de les étudier.

L'éventualité d'un mélange de phages dans une souche a déjà été envisagée par certains auteurs, en particulier par Fredericq [**80**], qui n'a du reste pas pu prouver l'existence d'un tel mélange.

1) *Essais de séparation avec un séparateur de germes.*

Si la séparation des bactéries est relativement aisée au moyen du micromanipulateur, et très commode avec le séparateur de germes, il n'est guère possible d'employer l'un ou l'autre de ces procédés pour la séparation de particules aussi petites que les virus, et en particulier les bactériophages. Pour les virus, seules des dilutions très poussées peuvent permettre d'obtenir des « colonies » nées de cellule unique ; dans le cas du bactériophage, l'opération est particulièrement aisée, puisque, théoriquement, chaque plage a pour origine une bactérie infectée par un seul phage ; comme la possibilité d'une infection multiple ne peut cependant pas être écartée avec certitude, il convient, pour avoir une bonne séparа-

tion, de procéder à plusieurs passages : production de plages isolées, dissociation d'une de ces plages dans un peu de bouillon, production de plages isolées, etc.

Avant d'utiliser ce procédé, nous avons tout-de-même voulu nous rendre compte si le séparateur de germes était utilisable. Pour cela, nous avons introduit dans l'appareil 5 cc de phage, puis nous l'avons ensemencé sur une boîte de Petri contenant du milieu de base et de la gélose molle, elle-même ensemencée avec la souche 521/57. Pour les bactéries, un à cinq coups de pompe donnés avec la poire de caoutchouc suffisent pour obtenir un grand nombre de colonies. Dans le cas du bactériophage, c'est nettement insuffisant, et après plusieurs échecs, nous n'avons réussi à obtenir que 2 plages, en manœuvrant la poire une vingtaine de fois.

Il ne faut pas oublier que le séparateur de germes a été construit et étudié pour des bactéries, et que le diamètre des gouttes, s'il est suffisamment petit pour qu'une goutte ne contienne pas plus d'une bactérie, est assez grand pour que de nombreux phages puissent y être transportés. Or si deux phages (ou plus) sont transportés dans une même goutte, ils sont très près l'un de l'autre, et, lorsqu'ils tombent sur le milieu de culture ensemencé avec des bactéries, il y a de fortes chances qu'ils se fixent sur la même bactérie. L'infection multiple est donc plus probable par cette technique qu'avec la méthode des dilutions. C'est donc un mauvais système de séparation.

Il serait peut-être possible de construire sur le même principe un appareil permettant la séparation des virus ; l'aérosol devrait être dans ce cas beaucoup plus fin, ce qui pose un certain nombre de problèmes. Il y aurait là matière à d'intéressantes recherches.

Le fait que 2 plages seulement se soient formées après un ensemencement pourtant abondant s'explique, à notre avis, de la façon suivante : il est probable que de très nombreux phages, transportés par l'aérosol, soient tombés à la surface de la gélose molle ; les chances que ces phages se fixent sur des bactéries sont très faibles, car les bactéries ne sont pas ensemencées à la surface de la gélose molle, mais à l'intérieur, ce qui rend difficile le contact bactérie-bactériophage. Il faut donc renoncer à employer le séparateur de germes pour séparer les bactériophages.

2) *Essais de séparation au moyen d'une méthode biologique.*

Ainsi que nous l'avons déjà dit, l'étude de l'hétérogénéité des souches bactériennes (le problème est à peu près le même pour les virus) peut être conduite de deux façons différentes suivant la nature de cette hétérogénéité. Dans le cas de deux souches très différentes par leur pigmentation par exemple, ou encore par leur vitesse de croissance, le seul examen des colonies apparues après passage par le séparateur de germes permet de les distinguer très facilement (couleur ou taille différentes). Il suffit dans ce cas de repiquer séparément les deux sortes, et l'étude des deux filières peut se faire sans difficultés. Par contre, quand l'hétérogénéité d'une souche se manifeste par des différences de sensibilité au bactério-

phage ou aux antibiotiques, la séparation est plus compliquée. Il y a en effet une grande quantité de filières, qui ne diffèrent que légèrement les unes des autres, et qu'on ne peut distinguer qu'après les avoir testées.

Dans le cas du bactériophage « Cossonay », nous aurions pu isoler 100 plages, puis préparer des stocks de phage au moyen de chacune d'entre elles, et enfin étudier les propriétés des 100 phages obtenus. Le procédé aurait été fort long. Avant de nous livrer à une telle série d'expériences, nous avons voulu d'abord voir si les plages étaient morphologiquement toutes semblables ou si certaines différences pouvaient être notées entre elles.

Nous avons utilisé pour cette étude la filière 521/57, afin d'écarter toutes les erreurs pouvant provenir de l'hétérogénéité de la souche bactérienne.

Après l'avoir dilué de façon convenable, nous avons ensemencé du bactériophage « Cossonay » sur 8 plaques, de façon à obtenir des plages. Six de ces plaques ont été comptées pour avoir le titre du phage, tandis que les deux autres, choisies au hasard, étaient mises de côté pour un emploi ultérieur.

Nous donnons les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous.

Filière N°	*Essai N°*	*Nombre de plages*	*Diam. des plages*
521/57	1	92	env. ⅓ des plages : 0,1 – 0,5 mm env. ⅔ des plages : 1 – 3 mm
521/57	2	84	»
521/57	3	92	»
521/57	4	93	»
521/57	5	93	»
521/57	6	86	»

Tableau 7

On s'aperçoit d'abord que le titre est presque constant et que la variation reste dans les limites de l'erreur admise. Le diamètre des plages est aussi remarquablement constant d'une boîte à l'autre, mais, dans chacune d'entre elles, on note la présence de deux types nettement distincts : un tiers des plages ont un diamètre inférieur à 0,5 mm, tandis que les autres plages ont toutes 1 mm et plus. Il n'y a pas de dimensions intermédiaires.

Nous avons dit plus haut que la présence de plages de diamètres différents pouvait être attribuée au fait que certaines bactéries sont infectées tardivement. Si l'on veut appliquer cette explication au cas de la filière 521/57, il faut admettre que les deux tiers des bactéries fixant un bactériophage s'infectent relativement tôt, tandis que le reste de ces bactéries s'infecte tardivement. Il serait étonnant qu'il en soit ainsi. En effet, s'il y a des infections tardives, celles-ci doivent se faire les unes après les autres et d'une façon régulière, et non pas par tranches successives.

Cette constatation nous a conduit à supposer la présence, dans le phage « Cossonay », de deux bactériophages différents, donnant l'un

des plages relativement grandes, et l'autre des plages relativement petites. Nous donnons, dans les pages qui suivent, la description des essais que nous avons faits pour vérifier cette hypothèse.

Les deux boîtes de Petri mises de côté dans l'expérience précédente montraient, elles aussi, des plages de deux types.

Cinq plages parmi les plus grandes ont été prélevées au moyen d'un fil de platine et repiquées séparément dans 5 cc de bouillon, avec une certaine quantité de bactéries se trouvant autour de chacune d'entre elles. De même, cinq plages choisies parmi les plus petites ont été repiquées en bouillon. Les dix tubes, après une agitation vigoureuse, ont été laissés à l'étuve pendant 48 heures. Après ce délai, les contenus des tubes ont été filtrés séparément sur des bougies Chamberland L3, mouillées chacune au préalable avec 10 cc de bouillon stérile.

Les cinq tubes contenant les grandes plages étaient limpides au bout de leur séjour de l'étuve. Quatre des cinq tubes contenant les petites plages présentaient, après 48 heures à l'étuve, un léger voile, tandis que le cinquième était limpide. Chacun des filtrats obtenus a été ensuite dilué 100, 10'000 et 1'000'000 de fois en bouillon, puis chacune des dilutions a été titrée en présence de la filière 521/57.

Les résultats des titrations sont donnés dans les tableaux ci-dessous.

Note : la numérotation des filtrats comprend trois parties :

1°) *Grpl* signifie que le filtrat provient, à l'origine, du repiquage d'une grande plage ; *ppl* signifie que le filtrat provient, à l'origine, d'une petite plage.

2°) le *chiffre romain* indique le numéro d'ordre des plages de départ (5 grandes et 5 petites)

3°) le *chiffre arabe* entre parenthèses indique le nombre de passages faits depuis le début.

Filtrat	*Dilution*	*Nombre de plages*	*Diamètre*
Grpl I (1)	10^{-6}	53	2 — 3 mm
		7	0,1 — 0,5 mm
Grpl II (1)	10^{-6}	136	1 — 3 mm
		3	0,1 — 0,5 mm
Grpl III (1)	10^{-6}	213	2 — 3 mm
		5	0,1 — 0,5 mm
Grpl IV (1)	10^{-6}	27	2 — 3 mm
		2	0,1 — 0,5 mm
Grpl V (1)	10^{-4}	230	1 — 3 mm
		15	0,1 — 0,5 mm

Tableau 8

Filtrat	*Dilution*	*Nombre de plages*	*Diamètre*
ppl I (1)	10^{-4}	61	0,1 — 0,5 mm
ppl II (1)	10^{-6}	277	1 — 3 mm
		7	0,1 — 0,5 mm
ppl III (1)	10^{-4}	56	0,1 — 0,5 mm
ppl IV (1)	10^{-4}	483	0,1 — 0,5 mm
ppl V (1)	10^{-6}	50	2 — 4 mm
		7	0,1 — 1 mm

Tableau 9

Discussion.

La séparation du phage à grandes plages et du phage à petites plages semble avoir réussi partiellement.

Les cinq repiquages de grandes plages donnent encore des plages des deux sortes, mais la proportion de petites plages est nettement inférieure à celle qu'on trouvait dans le phage total. Parmi les cinq repiquages de petites plages, trois ne donnent que des petites plages, tandis que deux donnent une majorité de grandes plages.

Comment peut-on expliquer ces différents résultats ? Il ne faut pas oublier que les petites plages, ainsi que nous l'avons déjà dit, peuvent être de deux sortes : une petite plage est, le plus souvent, formée par un phage dont le processus de lyse est lent ; mais une petite plage peut aussi être formée par un phage dont le processus de lyse est rapide, à partir d'une bactérie infectée tardivement ; or jusqu'à ce point de notre expérience aucun moyen ne nous permet de distinguer ces deux sortes de petites plages, si ce n'est par les résultats que donnent les repiquages des unes et des autres. Il est évident que les particules de phage se trouvant dans une petite plage provenant d'une bactérie infectée tardivement par un phage à grandes plages donneront, si elles sont repiquées, une majorité de grandes plages (infection précoce). Dans notre expérience, il était donc nécessaire de repiquer plusieurs petites plages, afin d'être sûr que parmi elles se trouverait au moins une petite plage véritable, c'est-à-dire formée par un phage à petites plages.

Les filtrats ppl II (1) et ppl V (1), obtenus très certainement à partir de « fausses » petites plages, ont été laissés de côté, puisqu'ils ne donnaient pas les résultats attendus. Il reste encore à expliquer la présence de petites plages dans les filtrats obtenus à partir de grandes plages. Selon toute probabilité, nous nous trouvons encore en présence du phénomène signalé à plusieurs reprises : ces petites plages sont formées en réalité par du phage à grandes plages et ont pour origine une bactérie infectée tardivement. Nous avons tenté de prouver ce que nous avançons ; nous rendrons compte de ces essais dans un chapitre ultérieur.

Comme nous l'avons déjà dit, un seul passage ne suffit pas pour obtenir à coup sûr une filière pure de bactériophage, et cela pour diverses raisons. Nous savons que l'efficacité d'étalement absolue n'est jamais égale à 100 %. Il se trouve donc, à la surface d'une boîte de Petri où des plages se sont formées, une certaine quantité de particules de phage qui n'ont pas donné de plages, et dont la position ne peut pas être déterminée. Mais ces mêmes particules pourraient, dans d'autres conditions, donner naissance à des plages. Comme il est possible qu'une telle particule soit repiquée en même temps que la plage qu'on désire isoler, on voit l'erreur qui peut en résulter. D'autre part, les particules de phage peuvent diffuser dans le milieu de culture, à des distances variant avec la nature du bactériophage, avec la composition du milieu de culture, etc. Ces phages peuvent aussi être repiqués à l'insu de l'expérimentateur. Il faut donc pratiquer plusieurs fois de suite l'opération de repiquage d'une plage isolée pour être sûr d'avoir en mains une lignée pure.

Nous avons gardé, pour la suite des opérations, 3 filtrats de grandes plages et 3 filtrats de petites plages.

Chacun de ces filtrats a été ensemencé en présence de la filière 521/57 de façon à obtenir des plages isolées, puis une grande plage obtenue à partir de chaque filtrat Grpl et une petite plage obtenue à partir de chaque filtrat ppl ont été ensemencées séparément dans du bouillon et laissées 48 heures à l'étuve. Après filtration et dilution, chacune des filières a été titrée en présence de la souche 521/57.

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 10.

Filtrat	*Dilution*	*Nombre de plages*	*Diamètre*
Grpl I (2)	10^{-6}	3	3 mm
		3	0,5 mm
Grpl II (2)	10^{-6}	30	3 mm
		1	0,5 mm
Grpl III (2)	10^{-6}	18	2 — 3 mm
		5	0,5 mm
ppl I (2)	10^{-6}	5	0,1 — 0,5 mm
ppl III (2)	10^{-6}	177	0,1 — 0,5 mm
ppl IV (2)	10^{-4}	21	0,1 — 0,3 mm

Tableau 10

Discussion.

Les trois filtrats de petites plages (deuxième passage) ne donnent plus que des petites plages, et la séparation semble avoir réussi. Par contre, on constate qu'il y a encore des petites plages dans les trois filtrats de grandes plages ; bien que ces petites plages puissent être formées par du phage à grandes plages à partir d'une bactérie infectée tardivement, nous avons voulu faire encore un passage afin d'être sûr d'avoir isolé une lignée pure.

Le filtrat Grpl I (2), donnant un mélange de petites et de grandes plages en quantités égales, est définitivement laissé de côté.

Par contre nous avons fait un nouveau repiquage à partir d'une grande plage donnée par le filtrat Grpl II (2) et un autre à partir d'une grande plage donnée par le filtrat Grpl III (2). Après un séjour de 48 heures à l'étuve, ces nouvelles cultures ont été filtrées, diluées et titrées en présence de la souche 521/57.

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau suivant.

Filtrat	*Dilution*	*Nombre de plages*	*Diamètre*
Grpl II (3)	10^{-6}	9	3 mm
		3	0,1 — 0,5 mm
Grpl III (3)	10^{-6}	112	1 — 3 mm
		2	0,1 — 0,5 mm

Tableau 11

Discussion.

Le filtrat Grpl II (3) donne de mauvais résultats ; la proportion de petites plages est en effet plus grande que lors du passage précédent Grpl II (2). Ce filtrat est donc abandonné. Par contre, le filtrat Grpl III (3) ne contient plus qu'environ 2 % de petites plages, ce qui marque une amélioration depuis le deuxième repiquage Grpl III (2). Ces quelques petites plages ont probablement pour origine des bactéries infectées tardivement. A titre de vérification, nous avons fait encore cinq passages successifs à partir de Grpl III (3), mais à aucun moment de ces essais, nous n'avons pu obtenir de filtrat ne donnant que des grandes plages. La proportion des petites plages variait en effet entre 0,5 et 10 %.

La pureté du filtrat Grpl III (3) étant ainsi démontrée provisoirement (d'autres essais ont été faits ultérieurement, dont nous parlerons plus loin), c'est ce filtrat qui a servi à la préparation d'un stock de phage.

3) *Préparation de stocks de phages séparés.*

La technique de préparation de tels stocks a été décrite à la page 13. Au total, quatre phages différents ont été préparés :

1) A partir du filtrat ppl I (2). Nous avons donné à ce phage le nom de *Co-p I.*
2) A partir du filtrat ppl IV (2). Le nom de ce phage est *Co-p IV.*
3) A partir du filtrat Grpl III (3). Le nom de ce phage est *Co-g III.*

La préparation du quatrième phage sera donnée plus loin.

Chacun des trois premiers phages a été ensuite titré pour vérifier la morphologie des plages. Les résultats de ces titrations sont donnés dans le tableau 12.

Phage	*Dilution*	*Nombre de plages*	*Diamètre*
Co-p I	10^{-6}	184	0,1 — 0,5 mm
			(rares plages de 2 mm)
Co-p IV	10^{-7}	135	0,1 — 0,5 mm
Co-g III	10^{-6}	207	1 — 3 mm
		20	0,3 — 0,5 mm

Tableau 12

Discussion.

On remarque tout d'abord que le phage préparé à partir d'un filtrat qui ne donnait que des petites plages donne de nouveau des grandes, qui ne sont du reste pas très abondantes (phage Co-p I). Nous avons laissé ce phage de côté, puisque le phage Co-p IV donnait de meilleurs résultats. Mais cette apparente pureté morphologique des plages formées par le phage Co-p IV ne correspond pas à la réalité.

En effet, si la dilution à 10^{-7} ne donne que des petites plages, il n'en est plus de même de la dilution à 10^{-6}. A cette dilution, les petites plages sont très nombreuses ; elles sont même parfois confluentes. Mais on peut

noter la présence de rares plages nettement plus grandes que les autres (2 — 3 mm). L'examen d'une plaque ensemencée avec la dilution 10^{-5} confirme cette observation. Dans ce cas, les plages sont presque toutes confluentes, mais on peut voir cependant que plusieurs d'entre elles ont un diamètre supérieur à 2 mm. La présence de ces grandes plages est difficilement explicable au premier abord. En effet, le filtrat qui avait servi à la préparation du phage Co-p IV ne donnait que de petites plages, même à de faibles dilutions. Cette question sera discutée dans une autre partie de ce travail.

Pour nous assurer qu'aucune faute n'avait été commise au cours des différentes manipulations, nous avons fait encore un certain nombre d'essais. Nous avons préparé à nouveau un phage à partir du filtrat ppl IV (2). Le phage obtenu donnait de nouveau une certaine proportion de grandes plages parmi les petites (0,2 à 0,5 %).

Enfin, nous avons préparé un phage en cultivant en présence de la souche 521/57 5 cc de la dilution 10^{-7} du phage Co-p IV. Le nouveau phage, titré en présence de la souche 521/57, et que nous avons appelé *Co-p IVa,* s'est révélé tout-à-fait comparable au phage Co-p IV. Ce phage donne en effet uniquement des petites plages aux fortes dilutions, tandis qu'il donne quelques grandes plages (environ 0,2 %) aux faibles dilutions.

Notre stock de Co-g III s'étant légèrement troublé après un séjour de quelques jours à la glacière, nous l'avons refiltré dans sa totalité, et lui avons donné le nom de *Co-g IIIa.*

Nous avons fait, avec les phages Co-g IIIa et Co-p IV, un grand nombre d'essais dont nous allons rendre compte dans les pages qui suivent. Nous avons dû de temps à autre renouveler le stock. Les noms de ces deux phages ont été conservés quand la préparation était faite par la méthode décrite à la page 13, au moyen de la souche 521/57.

Étude des variétés à grandes et à petites plages du bactériophage « Cossonay »

Avant d'étudier en détail les propriétés des deux sortes de phage obtenues, nous avons voulu voir si leur morphologie était indentique ou si des différences pouvaient être notées.

a) Examen au microscope électronique.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'examen au microscope électronique des bactériophages. La principale difficulté est d'obtenir un titre suffisamment élevé pour que la recherche des phages sur les préparations ne soit pas trop longue. Dans les meilleures conditions, qui doivent être déterminées soigneusement, on peut arriver à obtenir 10^{11} phages/cc pour des coliphages. Mais cette limite théorique est rarement atteinte, parce qu'une partie des phages libérés lors de la lyse sont très rapidement adsorbés par des bactéries non encore lysés ; ces bactéries ne pourront plus libérer de phages, car à ce moment la fin de la phase de croissance logarithmique des bactéries est atteinte, et le phénomène de lyse ne peut plus se produire normalement.

Lors de nos essais, les titres les plus hauts obtenus avec des mycobactériophages ne dépassaient pas 2×10^{10}. Ce titre est suffisant pour l'observation courante au microscope électronique, mais si on désire avoir un grand nombre de phages dans chaque champ microscopique, il faut utiliser d'autres méthodes.

A. Méthodes de concentration.

Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'obtenir indirectement des titres élevés. Nous avons essayé les trois qui sont décrites ci-dessous.

1) *Concentration du phage par évaporation sous vide* [**82**].

Nous avons préparé 1 litre de bactériophage, puis nous l'avons évaporé sous vide à une température de 30° environ, jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 50 cc. Théoriquement, le titre du phage concentré doit être 20 fois plus élevé que dans le bouillon initial.

Or les résultats pratiques sont beaucoup moins bons que ceux que la théorie pourrait laisser attendre. En effet, une partie du milieu de culture précépite pendant l'évaporation. Il faut éliminer ensuite ce précépité par centrifugation. C'est à ce stade qu'une grande partie des phages est perdue. Nous avons donc abandonné ce procédé.

2) *Concentration par centrifugation.*

Un excellent moyen d'obtenir un phage d'un titre élevé est la centrifugation à grande vitesse.

Dans l'une de nos expériences, donnée ici à titre d'exemple, nous sommes parti d'un phage ayant un titre de $1{,}3 \times 10^9$/cc. Nous avons ensuite centrifugé 20 cc de ce phage à 25'000 t/min. pendant 70 minutes. Il s'est formé une très mince pellicule blanchâtre dans le fond du tube. Cette pellicule a été reprise dans

quelques gouttes de bouillon. Le titre de cette nouvelle suspension atteignait $7{,}3 \times 10^{10}$, ce qui est suffisant pour une observation commode au microscope électronique.

Mais les préparations faites avec une telle suspension sont sales, car, lors de la centrifugation, les débris bactériens et d'autres particules du même ordre de grandeur que les bactériophages, et qui ont donc pu passer à travers le filtre, sont entraînés vers le fond du tube en même temps que les phages. Si dans ce cas la méthode de concentration proprement dite donne satisfaction, elle ne peut malheureusement pas être utilisée pour la préparation des grilles pour la microscopie électronique.

3) *Concentration par culture en milieu semi-solide.*

La troisième méthode de concentration que nous avons essayée est de loin la meilleure. Il s'agit d'une technique de culture en milieu semi-solide. Elle est due à SWANSTROM et ADAMS [**83**].

On ensemence, d'après la méthode de Gratia, une boîte de Petri contenant de la gélose solide comme couche de base ; cet ensemencement se fait en coulant à la surface de la couche de base une certaine quantité de gélose molle à laquelle on a ajouté une souche de bactéries sensibles et du bactériophage à une concentration telle qu'il se forme de 10^5 à 10^6 plages après incubation. Il va sans dire que les plages seront confluentes. Comme une plage de 2 mm peut contenir de 10^7 à 10^9 phages, on comprend que le nombre total des phages sur une telle plaque puisse atteindre plus de 10^{12}. Pour prélever ces phages, on ajoute 5 cc de bouillon dans lequel on dissocie la gélose molle (il est prudent de faire l'opération sur 4 boîtes de Petri au moins). On transvase le mélange de gélose molle et de bouillon dans un tube à centrifuger, on l'agite pendant quelques minutes pour avoir un mélange bien homogène, puis on le centrifuge pendant 20 minutes à 3000 t/min. Le surnageant est très limpide et peut être aspiré à la pipette très facilement.

Il est évident que cette méthode d'extraction ne permet pas de récupérer tous les phages qui se trouvaient dans la culture ; il en reste une quantité non négligeable dans la gélose molle (culot de centrifugation) et même dans la boîte de Petri. Mais malgré le rendement relativement mauvais, on obtient encore des titres élevés, généralement supérieurs à 5×10^{11}, ce qui est parfois trop concentré pour l'examen au microscope électronique. Il suffit alors de faire une dilution dans du bouillon, ce qui offre l'avantage de diluer également les débris bactériens. Les préparations obtenues avec ces « concentrés dilués » sont très satisfaisantes.

B. Préparations pour la microscopie électronique.

Il existe un grand nombre de méthodes pour la préparation des grilles servant de porte-objets. Nous n'entrerons pas dans les détails de chacune d'entre elles ; nous nous bornerons à mentionner celles que nous avons utilisées au début, et que nous avons abandonnées par la suite au profit d'une technique meilleure.

1) *Méthode simple.*

On laisse tomber une goutte de phage concentré sur la membrane de collodion recouvrant le porte-objets. Les images obtenues ne sont pas de bonne qualité à cause de la présence de matières provenant du bouillon.

2) *Microdialyse.*

On projette sur la membrane de collodion un aérosol préparé avec une suspension concentrée de bactériophage. Les préparations obtenues sont bonnes, mais on n'arrive pas à obtenir une grande quantité de phages dans le même champ microscopique, même en partant d'un phage à titre élevé.

3) *Filtration sur agar.*

Cette technique, mise au point par E. et G. Kellenberger [84], est de loin la meilleure.

On prépare de la gélose à partir du milieu liquide utilisé pour la suspension concentrée de phage. Pour cela, on ajoute au milieu liquide 30 % d'eau distillée et 15 g d'agar par litre de milieu dilué. Après stérilisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri, puis séché dans un four à circulation d'air à 42° pendant une heure. Le milieu perd par évaporation l'eau qu'on avait ajoutée au début ; de cette façon, le milieu solide a la même concentration en sels que le milieu de suspension des phages, mais sa surface est très avide d'eau. On dégraisse les boîtes en faisant couler à leur surface de l'éther de pétrole distillé. On verse ensuite une solution de collodion (0,2 % dans de l'acétate d'amyle technique) à la surface du milieu, on rejette l'excès et on laisse sécher pendant 6 heures.

On dépose alors 5 gouttes de la suspension de bactériophage à la surface de la boîte, on les étale avec un râteau de verre en prenant garde de ne pas abîmer la très mince couche de collodion, et on laisse filtrer pendant 10 à 20 minutes. La fin de la filtration se voit très bien, car le collodion a un aspect irisé lorsqu'il est à nouveau sec.

On fixe aux vapeurs de formol pendant 7 minutes. Ensuite, on découpe un petit bloc d'agar avec une spatule, et on l'immerge dans une solution de nitrate de lanthane à 2 %. La membrane de collodion se détache et flotte à la surface de la solution. On pêche cette membrane au moyen de quelques grilles porte-objets, qu'on sèche ensuite en les appliquant sur du papier buvard.

L'ombrage se fait sous vide par les méthodes habituelles. Dans nos essais, nous avons employé un alliage platine-or-iridium (« UGDO 1003 »).

La bonne marche de la filtration dépend de nombreux facteurs, dont certains sont inconnus ; la qualité de l'acétate d'amyle utilisé comme solvant du collodion est très importante, et l'acétate d'amyle pur ne convient pas.

En préparant pour chaque échantillon deux ou trois boîtes différentes, on est sûr d'obtenir au moins une bonne filtration.

C. Résultats des essais personnels.

Nos premiers essais ont porté sur les phages Co-p IV et Co-g IIIa, dont nous avons fait un certain nombre de préparations.

L'examen au microscope électronique nous a permis de prouver de façon indiscutable que les deux types isolés sont différents. En effet, alors que le phage Co-p IV a une tête parfaitement sphérique, le phage Co-g IIIa possède une tête allongée (voir les deux photographies en hors-texte).

Nous indiquons dans le tableau suivant les dimensions de chacun des deux types (les dimensions indiquées sont des moyennes comptées sur une quinzaine de préparations).

Phage	*Tête*	*Queue*
Co-p IV	75 mμ	260 mμ
Co-g IIIa	100 x 50 mμ	250 mμ

Tableau 13

Discussion.

Dans le chapitre consacré à la classification des bactériophages, nous traiterons de l'importance de la morphologie.

Si la variété à tête allongée semble être la plus fréquente chez les mycobactériophages, la variété à tête ronde est également connue et a déjà été décrite dans un certain nombre de travaux. Penso et Ortali, en 1949 [**12**] présentent des photographies de mycophages au microscope électronique ; certains de leur phages ont des têtes allongées, tandis que les autres ont des têtes rondes. Depuis ces premiers travaux, un certain nombre de photographies de mycophages observés au microscope électronique ont été publiées, et les phages montrés avaient l'une ou l'autre de ces morphologies.

L'examen des deux types de bactériophage « Cossonay » permet de juger de leur pureté. En effet, nous avons observé des dizaines de préparations, qui comprenaient chacune des centaines ou même des milliers de phages, mais, malgré un examen approfondi de toutes les préparations, nous n'avons jamais observé d'hétérogénéité dans la morphologie des phages examinés : toutes les préparations faites avec du Co-p IV ont montré des phages à tête ronde, et toutes les préparations de Co-g IIIa ont montré des phages à tête longue. Nous avons par la suite prouvé la pureté des deux types isolés grâce à des méthodes biologiques. Nous y reviendrons dans un autre chapitre.

Signalons enfin que dans les premières préparations pour l'examen au microscope électronique, faites à partir du phage « Cossonay » total, nous n'avons observé que des têtes rondes, ce qui est facilement explicable. En effet, la technique utilisée pour la préparation des grilles porte-objets donne des concentrations élevées en phages. L'examen au microscope électronique montre des amas de phages comprenant des dizaines d'individus ; mais cet examen ne porte que sur une surface très réduite ; on ne voit donc que les phages d'un endroit déterminé, et on peut fort bien passer à côté d'une série de phages ayant une autre morphologie, surtout dans le cas d'un examen rapide. Pour vérifier que le phage « Cossonay » total contient bien les deux types, nous en avons fait un certain nombre de préparations. Sur les unes nous n'avons trouvé que le type à tête ronde, sur les autres nous avons vu le type à tête allongée, mais il nous a été impossible de voir les deux types à la fois sur la même préparation, et à plus forte raison dans le même champ microscopique.

Après avoir montré l'hétérogénéité morphologique des plages produites par le phage « Cossonay », puis réussi à isoler du phage total deux variétés morphologiquement distinctes, nous avons étudié parallèlement un certain nombre de propriétés de ces deux variétés, afin de les comparer.

Nous reviendrons tout d'abord au spectre d'action, que nous avions dû provisoirement laisser de côté pour étudier un certain nombre d'autres problèmes.

b) **Spectre d'action des bactériophages Co-p IV et Co-g IIIa.**

La technique employée pour l'étude du spectre d'action est celle qui a déjà été décrite à la page 17. Nous donnons, dans le tableau 14, les résultats de ces essais, en adoptant les abréviations suivantes :

LC = lyse confluente ; la gélose est complètement à nu sur toute la surface occupée par la goutte du phage

LCV = lyse confluente en partie voilée par une couche continue de de culture secondaire

LCVV = lyse confluente presque complètement voilée par une couche continue de culture secondaire

Lc = lyse presque confluente

+++, ++, + = nombre décroissant de plages

– = aucune réaction visible

Ces abréviations, à part de légères modifications, sont celles qui sont couramment employées par les auteurs de langue française pour la notation des réactions de lysotypie [**85**]. Les essais dont nous donnons les résultats n'ont pas de valeur pour la lysotypie, qui sera étudiée dans un chapitre ultérieur. Ils permettent simplement de classer en « sensibles » et en « résistantes » les souches de mycobactéries que nous avions à notre disposition.

Nous donnons également dans le tableau 14 les résultats d'un certain nombre d'essais faits avec le phage « Cossonay » total avant l'isolement des deux variétés. On y relèvera quelques anomalies sur lesquelles nous reviendrons.

Tableau 14

Spectre d'action des phages Co-p IV, Co-g IIIa et Cossonay total

Souche	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Cossonay tot.*
15	–	–	–
17	LCV	LCV	LCV
28	–	–	–
38	–	–	–
51/o	–	–	–
52	–	–	–
54/b	–	–	–
54/o	–	–	–
55/b	LC	LC	LC
55/o	–	–	–
59	+++	LC	LC
60	+++	LC	LC
61	–	–	–
62	–	–	–
63	–	–	–

Souche	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Cossonay tot.*
67	–	–	–
68	LC	LC	LC
70	–	–	–
71	–	–	–
75	–	–	–
76	Lc	LC	LC
77	Lc	LC	LC
78	LCV	LCV	LCV
81	–	–	–
84	–	–	–
85	–	–	–
86	–	–	–
88	–	–	–
89	Lc	Lc	LCV
90	–	–	–
93	–	–	–
94	–	–	–
133	LC	LCV	LCV
134	–	–	–
135	–	–	–
136	–	–	–
137	+++	LCVV	–
139	–	–	–
143	–	–	–
144	–	–	–
145	LCV	LCV	LCV
149	–	–	–
150	–	–	–
152	LCV	LCV	LCV
153	–	–	–
154	–	–	–
171	–	–	–
172	Lc	+++	LCV
173	–	–	–
174	–	–	–
175	–	–	–
176	Lc	++	LCV
178	–	–	–
180	–	–	–
182	+++	++	LCVV
184	–	–	–
185	–	–	–
188	–	–	–
191	–	–	–
194	–	–	–
195	–	–	–

Souche	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Cossonay tot.*
214	LC	LC	LC
229	–	–	–
230	–	–	–
233	–	–	–
234	–	–	–
235	–	–	–
237	–	–	–
239	–	–	–
521	LC	LC	LC
522	–	–	–
523	–	–	–
524	–	–	–
602	–	–	–
620	++	LCVV	LCVV
689	–	–	–
690	Lc	LC	LC
711	–	–	–
712	–	–	–
713	–	–	–
714	LC	LC	LC
725	LC	LC	LC
726	Lc	LC	LC
727	–	–	–
728	–	–	–
798	LC	LC	LC
799	LC	LC	LC
801	LC	–	–
804	LC	LC	LC
806	LCV	–	–
807	–	–	–
810	LCV	–	–
813	–	–	/ (*)
814	LCVV	–	/
817	–	–	/
818	LCV	LCVV	/
820	–	–	/
822	–	–	/
823	–	–	/
829	–	–	/
834	–	–	/
835	LCVV	LCVV	/
838	–	–	/
841	+++	LCVV	/
843	–	–	/
846	–	–	/

(*) / = réaction pas faite.

Souche	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Cossonay tot.*
847	–	–	/
849	–	–	/
853	–	–	/
857	–	–	/
858	–	–	/
860	+++	LCVV	/
861	–	–	/
865	–	–	/
867	+++	LC	/
868	Lc	LCV	/
871	–	–	/
872	–	–	/
882	–	–	/
883	LCVV	–	/
884	–	–	/
885	–	–	/
887	LC	LC	/
890	LC	LC	/
891	+++	LCVV	/
892	–	–	/
895	–	–	/
897	–	–	/
898	–	–	/
900	+	LCV	LCV
904	++	LCVV	LCVV
906	–	–	–
907	++	LCVV	LCVV
908	+++	LCV	LCV
909	+++	LC	LC
910	–	–	–
1024	–	–	–
1030	–	–	–
1101	–	–	–
1114	LC	LC	LC
1223	–	–	/
1224	–	–	/
1225	–	–	/
1227	–	–	/
1229	–	–	/
1233	–	–	/
1237	LC	LC	/
1241	–	–	/
1244	–	–	/
1246	–	–	/
1247	–	–	/

Discussion.

Un examen rapide du tableau ci-dessus permet déjà de constater une différence de propriétés biologiques entre les deux variétés Co-p IV et Co-g IIIa.

Dans une très brève note à la Société Française de Microbiologie [**86**], nous avons donné le résultat de la séparation des deux sortes de phages, et nous avons indiqué que la variété Co-g IIIa attaquait toutes les souches lysées par Co-p IV et qu'elle lysait elle-même environ deux fois plus de souches microbiennes que la variété Co-p IV. Or les résultats que nous donnons ci-dessus semblent contredire nos premières affirmations. Quelques explications à ce sujet sont nécessaires.

Nos premiers essais, dont nous n'avons pas donné le détail, avaient porté sur 47 des souches dont la liste a été donnée à la page 30. Sur ces 47 souches, 32 se sont montrées résistantes à l'action des deux variétés de phage. Parmi les 15 autres, 8 étaient sensibles aux deux variétés et 7 n'étaient lysables que par Co-g IIIa. Aucune des souches étudiées n'était sensible à Co-p IV seulement.

Quant aux résultats portés dans le tableau 14, ils peuvent se résumer comme suit :

Nombre total de souches étudiées :		151
Souches complètement résistantes :		104
Souches sensibles à Co-p IV :		47
Souches sensibles à Co-g IIIa :	42	
Souches sensibles à Co-g IIIa et pas à Co-p IV :		0
Souches sensibles à Co-p IV et pas à Co-g IIIa :	5	
	47	151

S'il est parfaitement compréhensible qu'un certain nombre de souches sensibles à Co-p IV et pas à Co-g IIIa aient été découvertes (ce groupe n'était pas représenté lors des premiers essais), il est étonnant que les 7 souches qui s'étaient auparavant montrées sensibles à Co-g IIIa et pas à Co-p IV ne soient plus représentées comme telles, quand bien même elles sont comprises dans les essais dont les résultats sont donnés dans le tableau 14.

Il s'agit des souches 59, 60, 68, 690, 726, 900 et 909. Ces souches, les derniers essais l'ont prouvé, sont sensibles aussi bien au phage Co-p IV qu'au phage Co-g IIIa. Si les variétés de phages employées au cours des deux séries d'essais ont été exactement les mêmes, les préparations étaient différentes, et par conséquent les titres étaient aussi différents. Or, nous l'avons déjà mentionné dans une autre partie de ce travail, et l'examen du tableau 14 permet de le vérifier, la sensibilité au bactériophage varie beaucoup d'une souche à l'autre. Si une souche est très peu sensible, l'efficacité d'étalement est faible, et seules quelques particules de phage seront capables de donner naissance à des plages visibles à l'œil nu. Dans la technique que nous utilisons pour la détermination du spectre d'action des phages, nous employons une certaine préparation de phage dont le

titre est déterminé. Si la souche est très sensible, on obtiendra une lyse confluente. Si la souche est moyennement sensible, on n'observera que quelques plages isolées, et si la souche est très peu sensible, il n'y aura qu'une ou deux plages ; il se peut même qu'il n'y en ait aucune.

C'est ce qui s'est produit avec les 7 souches dont nous venons de donner la liste. Dans la première série d'essais, le phage employé (Co-p IV) avait un titre relativement élevé, bien suffisant pour obtenir une lyse confluente avec plusieurs des souches examinées, mais trop bas pour avoir même des plages isolées avec certaines souches très peu sensibles. Dans la deuxième série d'essais, nous avons pris un phage ayant un titre plus élevé, ce qui nous a permis de trouver sensibles des souches que les premiers essais nous avaient fait considérer comme résistantes.

Nous avons étudié plus en détail ces différences de sensiblité en faisant des titrages exacts avec un certain nombre de souches sensibles, et nous allons en donner les résultats. Mais nous pouvons dès maintenant nous rendre compte de l'importance considérable que peut prendre le titre du phage lors de la détermination d'un spectre d'action.

Comme nous l'avons dit, la deuxième partie de nos essais nous a permis de reconnaître comme sensibles des souches que nous avions tenues pour résistantes dans la première partie. Il y a donc intérêt à employer des phages possédant le plus haut titre possible. Mais rien ne nous dit que des souches que nous considérons maintenant comme résistantes ne sont pas en fait très faiblement sensible à l'une ou l'autre des variétés du phage « Cossonay ». Il suffirait peut-être d'employer des phages de titre encore plus élevé. Cela nous entraînerait trop loin. Mais on voit qu'il ne suffit pas de dire qu'une souche est résistante à l'action d'un bactériophage quelconque ; encore faut-il préciser dans quelles conditions les essais ont été faits, et plus particulièrement quel a été le titre du phage employé.

c) **Etude détaillée de l'action de diverses préparations de phage « Cossonay » et de** Ph. polonus **sur 32 souches de mycobactéries.**

L'étude du spectre d'action des deux variétés de bactériophage « Cossonay » nous a permis de trouver 47 souches de mycobactéries sensibles. Cette étude montre en outre que ces souches sensibles sont loin d'avoir toutes le même comportement vis-à-vis des deux phages, mais d'autres essais sont nécessaires pour mieux connaître les propriétés réciproques des bactéries et des bactériophages.

En vue de cette étude, nous avons choisi 32 souches de mycobactéries sensibles. Outre les phages Co-p IV et Co-g IV (*), nous avons encore employé un certain nombre d'autres phages, les uns étant du bactériophage « Cossonay » total, d'autres diverses préparations des deux variétés isolées, le dernier un bactériophage reçu d'un autre laboratoire, et utilisé à titre de comparaison. Nous donnons ci-dessous le mode de préparation et l'origine de chacun des phages employés dans cette série d'essais.

(*) Tout notre stock de phage Co-g IIIa s'étant infecté, nous avons dû isoler à nouveau la variété à grandes plages. La méthode employée est donnée dans le texte.

Phage Co-27. 6. 58 : il s'agit d'un bactériophage « Cossonay » total, préparé selon la technique habituelle en présence de la souche 521/57.

Phage Co-20. 11. 58 : c'est également un bactériophage « Cossonay » total, préparé par culture aérée au moyen du phage Co-27. 6. 58 et de la souche 909.

Phage Co-st : c'est un bactériophage « Cossonay » total, préparé de la façon suivante : 6 tubes de bouillon sont ensemencés chacun avec 0,3 cc de la souche 909 (culture de 48 heures en bouillon) et 0,2 cc de phage Co-27. 6. 58. Au bout de 48 heures, le contenu des 6 tubes est filtré sur bougie Chamberland L3. Deux nouveaux passages sur la souche 909 sont faits de la même manière, le dernier étant fait avec un plus grand nombre de tubes de façon à obtenir un stock suffisant.

Phage Co-g IV : il s'agit d'un nouvel isolement de la variété à grandes plages. Une boîte de Petri est ensemencée selon la technique de Gratia avec la souche 521/57 et du phage Co-st, dilué de façon à obtenir une dizaine de plages. La plus grande des plages est prélevée, dissociée en bouillon et filtrée. Le filtrat est dilué, puis ensemencé de façon à obtenir des plages isolées ; une grande plage est prélevée et traitée de la même manière qu'auparavant. Après un troisième passage, une grande plage est dissociée en bouillon, filtrée et ensemencée avec la souche 521/57.

La culture aérée est mise à l'étuve pendant 48 heures, puis filtrée. Le filtrat constitue le stock du nouveau phage, appelé Co-g IV, qui provoque la formation de grandes plages sur la souche 521/57 ; la morphologie de ce phage, vérifiée au microscope électronique, est exactement la même que celle de l'ancien phage Co-g IIIa.

Phages Co-p IV et Co-p IVa : la préparation de ces deux phages a été indiquée aux pages 67 et 68.

Phage Co-e : c'est un bactériophage obtenu par séparation sur la souche 909. A partir d'une plage obtenue en ensemençant selon Gratia du phage Co-27. 6. 58 avec la souche 909, nous avons fait 6 passages successifs, chaque passage étant fait selon ce modèle : isolement d'une grande plage, dissociation de la plage dans du bouillon, filtration et ensemencement selon Gratia en présence de la souche 909. Le dernier filtrat obtenu a été ensemencé dans du bouillon avec la souche 909 en culture aérée. Le filtrat de cette culture donne le phage Co-e.

Phage Co-k : un ensemencement a été fait selon la technique de Gratia à partir de phage Co-g IIIa dilué et de la souche 909. Une des plages obtenues a été dissociée en bouillon, puis filtrée. Le filtrat a été ensemencé en culture aérée dans du bouillon avec la souche 909. Le filtrat de cette culture donne le phage Co-k.

Phagus polonus : il s'agit d'un bactériophage isolé par WANDA MACANDER [**26**], que nous avons reçu par l'intermédiaire de Madame Dr Irène Lipska, de l'Institut municipal d'Hygiène de Varsovie. Le nom « Phagus polonus » n'est pas indiqué dans le travail original. Il nous a été proposé par la suite par l'auteur. Un stock de ce bactériophage a été préparé en faisant une culture aérée en présence de la souche 909.

Nos essais ont donc porté sur 32 souches sensibles de mycobactéries et sur 9 préparations de phages différentes. Les résultats obtenus auparavant et donnés dans le tableau 14 nous ont permis d'évaluer les titres qui devaient être obtenus, tout au moins pour les phages utilisés dans l'étude du spectre d'action. Mais, le plus souvent, nous avons dû faire de nombreux essais afin d'obtenir des cultures lisibles.

Nous donnons dans le tableau suivant (page 81), les résultats des titrations. Pour faciliter la lecture du tableau et la comparaison des titres obtenus, nous donnons les logarithmes des titres et non pas les titres eux-mêmes.

Les abréviations suivantes sont utilisées :

1 = Co-27. 6. 58
2 = Co-20. 11. 58
3 = Co-st
4 = Co-g IV
5 = Co-p IV
6 = Co-p IVa
7 = Co-e
8 = Co-k
9 = « Phagus polonus »

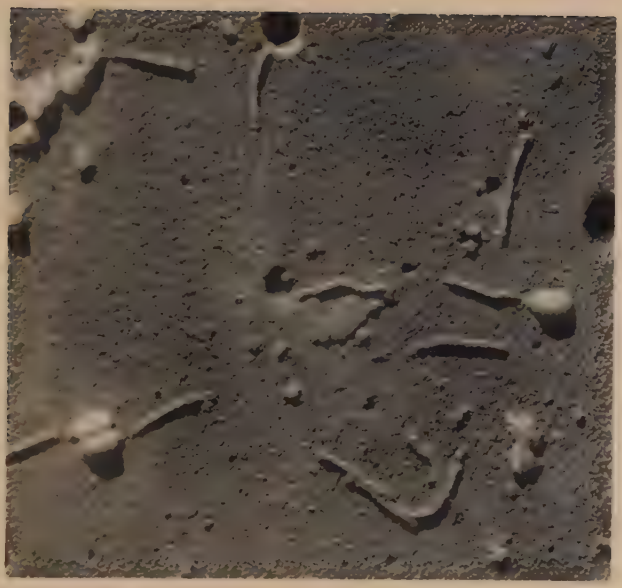
Le signe ---- signifie que, les essais d'orientation n'ayant donné aucune lyse visible (méthode analogue à celle employée pour la détermination du spectre d'action), il n'a pas été fait de mesure du titre.

Le signe : : : : signifie que, malgré l'existence d'une réaction positive au cours des essais d'orientation, il n'a pas été possible de déterminer le titre, bien que l'expérience ait été répétée un grand nombre de fois, avec le phage pur et des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-7}.

Discussion.

Le tableau de la page 81 contient, sous une forme très condensée, une quantité de renseignements du plus haut intérêt. Avant de l'examiner en détail, il convient tout d'abord de calculer en logarithmes la marge d'erreur. Si l'on admet, comme nous l'avons fait dès le début de nos essais, une erreur de ± 20 %, cela signifie que la valeur minimum du titre est le 80 % du chiffre trouvé, et que la valeur maximum est le 120 % du chiffre trouvé. Dans le calcul logarithmique, cela signifie que le log de la valeur minimum sera inférieur de 0,1 au chiffre indiqué dans le tableau, qui est lui-même le log du titre trouvé ; le log de la valeur maximum sera supérieur de 0,08 au chiffre indiqué dans le tableau. L'avantage réside dans le fait que ces deux chiffres (0,1 et 0,08) sont les mêmes pour toutes les valeurs indiquées dans le tableau.

Les souches 521, 798 et 1114 sont, rappelons-le, des repiquages de la souche appelée ATCC 607 ; la première a été reçue de M. Froman (Olive View, Calif.), la seconde directement de l'American Type Culture Collection, et la troisième par l'intermédiaire du Prof. Penso, de Rome. Enfin, 521/57 est une filière de 521 que nous avons isolée au cours d'une expérience précédente. Il est intéressant de vérifier si les résultats obtenus avec ces trois souches sont concordants. Pour les phages 2, 3 et 7, les résultats restent dans la limite d'erreur admise. Ces trois phages, il est intéressant de le noter, ont été préparés avec la souche 909. Pour d'autres phages, la concordance n'est bonne que pour deux des trois souches, tandis que pour le phage 5, les résultats sont passablement différents. Il faut se souvenir que la souche 521 (et par conséquent les souches 798 et 1114) n'est pas homogène vis-à-vis du phage « Cossonay ». Il est donc compréhensible que ces trois souches, cultivées séparément sur des milieux de culture différents et repiquées des centaines de fois, soient globa-



Phage Co-g IIIa
Gr. x 50'000

Phage Co-p IV
Gr. x 50'000

Clichés : *Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Lausanne*

Souches	*Phages*								
N°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*
17	7,29	9,25	8,07	9,96	9,64	9,98	7,98	8,22	6,60
55/b	4,91	9,19	8,16	7,18	7,00	6,74	7,78	8,32	7,74
59	4,85	7,85	6,97	8,40	3,02	3,35	6,57	8,06	6,26
60	4,34	9,09	8,05	6,98	3,54	4,00	7,48	8,16	6,34
68	4,91	9,19	8,11	7,29	6,90	6,78	8,00	8,35	6,48
76	4,23	9,02	7,94	6,97	4,57	4,48	7,27	8,10	6,16
77	4,04	8,85	7,75	6,92	4,20	4,06	7,74	8,10	6,04
78	4,06	8,72	8,11	7,27	7,04	7,08	7,39	8,00	7,60
89	3,20	5,90	4,19	5,39	4,39	5,31	4,70	4,90	3,11
133	6,11	9,07	7,79	8,53	8,64	8,69	7,32	7,82	7,36
152	4,32	9,13	7,85	6,81	6,23	6,41	7,74	8,22	6,40
172	::::	5,51	2,39	5,51	4,63	5,41	4,14	::::	2,85
176	::::	5,65	4,70	4,51	4,64	5,42	4,98	::::	::::
182	3,70	6,89	5,92	8,13	4,20	4,51	5,84	6,37	2,72
214	5,84	9,07	8,09	8,54	8,75	9,13	7,78	8,28	6,28
521/57	7,11	9,18	8,06	9,23	9,57	9,96	7,85	8,15	6,48
690	4,42	9,02	8,00	6,93	4,02	4,13	7,88	7,93	7,67
714	4,31	8,94	8,02	7,01	5,18	5,00	7,98	8,41	7,69
725	4,70	9,27	8,02	7,10	6,87	7,05	7,42	8,00	7,59
726	4,39	9,31	8,02	7,05	4,58	5,36	7,82	8,31	6,20
798	6,68	9,18	7,96	9,49	9,33	9,51	7,88	8,23	6,28
799	6,53	9,12	8,11	8,57	8,62	9,29	7,69	8,33	6,31
801	----	----	----	----	5,56	6,05	----	----	----
804	5,13	8,15	7,26	9,52	8,69	9,12	7,17	7,45	6,18
806	----	----	----	----	3,85	4,90	----	----	----
810	----	----	----	----	5,69	5,78	----	----	----
900	3,99	7,20	5,83	7,69	5,11	4,38	5,30	5,90	3,60
904	::::	7,13	5,78	7,38	4,28	4,08	::::	5,90	3,60
907	4,10	7,39	5,65	8,06	4,30	4,24	::::	5,88	4,00
908	4,35	6,92	6,17	7,48	4,80	5,07	5,65	5,82	4,32
909	4,70	9,06	7,95	6,98	3,79	4,08	7,62	8,18	6,14
1114	7,10	9,14	8,04	9,13	8,79	9,95	7,78	8,34	6,45

Tableau 15 (logarithmes des titres)

lement différentes les unes des autres, parce que l'une des filières a pu se développer différemment des autres dans l'une ou l'autre des trois souches.

Les phages 5 et 6 (Co-p IV et Co-p IVa) sont très proches l'un de l'autre, ce qui n'est pas étonnant quand on sait comment ils ont été préparés ; on note cependant quelques différences, même si l'on tient compte du fait que Co-p IVa a un titre supérieur à celui de Co-p IV. Mais on remarque que leur spectre d'action est identique. En effet, les 2 phages attaquent les souches 801, 806 et 810, qui ne sont lysables par aucun des autres phages. Nous avons estimé que les quelques différences observées ne sont pas suffisamment significatives pour justifier l'étude comparée des deux phages, et, par la suite, nous avons laissé de côté le phage Co-p IVa pour étudier exclusivement le phage Co-p IV.

On peut se demander pourquoi les 3 préparations de phage « Cossonay » total (phages 1, 2 et 3) ne lysent pas les souches 801, 806 et 810, qui sont pourtant lysables par le phage Co-p IV, isolé lui-même du phage « Cossonay » total. Le phage « Cossonay », d'où a été également isolé Co-g IV, ne peut pas être identique à lui-même au cours du temps. On sait en effet que le titre de tous les phages baisse à la longue, d'autant plus vite que la température est plus élevée. Nous verrons plus loin que Co-p IV est plus sensible à la chaleur que Co-g IV. Dans une préparation de phage « Cossonay » total, la proportion entre les deux variétés n'est donc pas constante, Co-p IV disparaissant plus rapidement que Co-g IV.

Dès le début de nos recherches, nous avons constaté que le phage Co-p IV ne se trouvait dans le phage total qu'en faible proportion, qui avait tendance à diminuer avec le temps. Comme l'efficacité d'étalement est faible pour les systèmes Co-p IV/801, Co-p IV/806 et Co-p IV/810 en comparaison du système Co-p IV / 521/57 (près de 10'000 fois plus faible pour 801 et 810, plus de 500'000 fois pour 806), on comprend que le phage total n'ait pas d'action, surtout si la proportion de Co-p IV est très petite.

Il est d'autre part important de noter que de nouvelles cultures du phage total ne permettent pas d'améliorer les résultats, et ceci pour une raison facile à comprendre.

Supposons que nous préparons un stock de phage total en ensemençant dans du bouillon une certaine quantité de bactéries 521/57 et du phage total contenant les deux variétés en quantités absolument égales. Que va-t-il se passer ? Les phages des deux sortes vont se fixer sur les bactéries, qui sont en pleine phase logarithmique de croissance. Ainsi que l'examen des cultures sur un milieu solide l'a prouvé, le comportement des deux variétés n'est pas identique. En effet, le processus de la lyse est plus rapide pour le phage à grandes plages que pour l'autre. Sans avoir fait de mesures précises, nous pouvons admettre que pour Co-g IV, la fixation est plus rapide, le temps de latence plus bref ; au bout d'un certain temps, les bactéries infectées vont libérer en se lysant des phages en grande quantité, et les premières bactéries qui le feront seront celles qui auront été infectées par le phage Co-g IV. A ce moment, le

milieu de culture va s'enrichir en phages Co-g IV ; ces phages vont alors se fixer sur des bactéries qui n'avaient pas encore été infectées.

A la fin de l'opération, la proportion des deux variétés de phages ne sera plus la même qu'au début, la variété à grandes plages s'étant multipliée plus vite. A chaque passage, ce phénomène se répétera et la proportion de phages à petites plages pourra devenir négligeable.

Pour obtenir la lyse des souches 801, 806 et 810, un tel « phage total » ne convient pas, à cause de la très faible efficacité d'étalement de la variété à petites plages.

Nous remarquons d'autre part que le phage 9 (« Phagus polonus ») attaque exactement les mêmes souches que le phage Co-g IV, ce qui ne signifie pas que ces deux phages sont identiques. Nous verrons plus loin quelles sont les relations antigéniques entre Co-p IV, Co-g IV et « Phagus polonus ». Nous constatons dès maintenant que les titres obtenus ne sont pas les mêmes et ne varient pas de la même façon d'une souche à l'autre.

Nous allons maintenant examiner successivement les résultats obtenus avec chacun des phages.

Phage N° 1 (Co-27. 6. 58) : Le titre le plus élevé mesuré avec ce phage est celui qui a été obtenu avec la souche 17. Cette souche 17 est du reste la plus sensible de toutes les souches essayées avec les phages d'origine Cossonay. Nous avons déjà noté les résultats des trois souches qui correspondent à ATCC 607. Le titre le plus bas obtenu avec ce phage est celui qui a été mesuré avec la souche 89, l'efficacité d'étalement étant dans ce cas à peine 1/10'000ème de celle obtenue avec la souche 17. Il faut encore remarquer que les souches 690 et 909 *(Mycob. smegmatis)* montrent un titre relativement bas. Mais il faut se souvenir que les résultats donnés par un bactériophage dont on sait qu'il est un mélange ne peuvent pas être considérés comme très précis, puisqu'on sait que ce mélange est instable.

Phage N° 2 (Co-20. 11. 58) : La souche donnant le titre le plus élevé est la souche 17, tandis que le titre le plus bas est obtenu avec la souche 172. L'efficacité d'étalement avec cette dernière souche est environ 55'000 fois plus petite qu'avec la souche 17. Les titres réels des phages 1 et 2 ne sont pas identiques ; pour la souche 17, que nous pouvons prendre comme référence, le titre du phage 2 est environ 100 fois plus élevé que celui du phage 1 ; on observe la même différence entre les titres des phages 1 et 2 avec les souches 521/57, 798 (la concordance est moins bonne) et 1114. Par contre, cette différence est bien plus grande pour d'autres souches. Pour la souche 59, par exemple, le titre du phage 2 est 1000 fois plus grand que celui du phage 1, et pour la souche 690 et la souche 909, il est plus de 10'000 fois plus grand. Il convient de retenir ce fait, que nous constaterons pour d'autres phages et dont nous donnerons l'explication ultérieurement.

Phage N° 3 (Co-st) : la souche 17 donne un titre élevé, et si d'autres souches donnent un titre légèrement supérieur, ces différences restent dans les limites de l'erreur que nous avons admise, et nous pouvons tout-de-même considérer que la plus haute efficacité d'étalement est obtenue avec la souche 17, ce qui facilitera certains calculs que nous aurons à faire par la suite. Quant au titre le plus bas, il est obtenu avec la souche 172, et sa valeur est environ 480'000 fois plus petite que celle que donne la souche 17. Nous remarquons que les souches 690 et 909 montrent un titre assez élevé et comparable à celui qu'on obtient avec la souche 17.

Phage N° 4 (Co-g IV) : le titre le plus élevé est celui qui est mesuré sur la souche 17, tandis que le titre le plus bas est obtenu avec la souche 176. Nous notons d'autre part les titres relativement bas donnés par les souches 690 et 909.

Phage N° 5 (Co-p IV) : la souche la plus sensible est de nouveau la souche 17. Le titre le plus bas est obtenu avec la souche 59. Le rapport entre les deux titres est d'environ 1/4'000'000. Ce rapport, qui est l'efficacité d'étalement relative, est le plus bas que nous avons trouvé au cours de nos essais. Les souches 690 et 909 montrent un titre relativement bas, qui est plus de 400'000 fois inférieur au titre donné par le même phage sur la souche 17.

Phage N° 7 (Co-e) : on peut encore admettre que c'est avec la souche 17 que le titre le plus élevé est obtenu ; la souche 68 donne, il est vrai, un titre très légèrement supérieur, mais l'écart n'est pas significatif parce qu'il reste dans les limites de l'erreur admise. Le titre le plus bas est obtenu avec la souche 172. On note enfin que les titres donnés par les souches 690 et 909 ont des valeurs du même ordre de grandeur que celui qui est donné par la souche 17.

Phage N° 8 (Co-k) : un grand nombre des souches examinées ont des titres comparables : les souches 17, 55/b, 68, 152, 214, 714, 726, 798, 799 et 1114 donnent les titres les plus hauts, tandis que la souche 89 donne le titre le plus bas. Les titres obtenus avec les souches 690 et 909 sont également élevés.

Phage N° 9 (« Phagus polonus ») : ce bactériophage ayant une autre origine que la phage « Cossonay », il est compréhensible que son action soit différente, même si elle s'exerce sur les mêmes souches. Le titre le plus élevé est obtenu avec la souche 55/b, tandis que le titre le plus bas est donné par la souche 182. Avec ce phage, les souches 690 et 909, qui avaient une sensibilité très voisine vis-à-vis des phages de la série « Cossonay », montrent des titres différents, l'un étant plus de 30 fois plus bas que l'autre.

Comme les phages utilisés pour les essais décrits dans les pages précédentes n'avaient pas le même titre, il est difficile de faire des comparaisons et de voir comment varie la sensibilité d'une même souche avec les différentes préparations utilisées.

Le moyen le plus commode pour comparer les sensibilités est de comparer les efficacités d'étalement relatives. On se souvient que l'efficacité d'étalement relative est le rapport entre le titre obtenu avec une souche donnée et le titre obtenu avec une souche de référence, généralement la souche la plus sensible, c'est-à-dire la souche donnant le titre le plus haut.

Là encore, l'emploi des logarithmes facilite les calculs et l'interprétation des résultats. L'efficacité d'étalement relative étant un rapport entre deux titres, le log de l'efficacité d'étalement relative est donné par la différence entre les log des deux titres. Dans un but de simplification, et afin d'avoir des logarithmes positifs, nous donnerons dans le tableau 16 (page 85) les logarithmes de l'inverse du rapport donnant l'efficacité d'étalement.

On remarquera cependant dans le tableau 16 un certain nombre de logarithmes négatifs ; il s'agit des souches ayant montré un titre supérieur à celui obtenu avec la souche 17, qui est prise comme souche de référence.

Souche	*Phages*							
N°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*7*	*8*	*9*
17	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	1,14
55/b	2,38	0,06	–0,09	2,82	2,64	0,20	–0,10	*0,00*
59	2,44	1,40	1,10	1,56	6,62	1,41	0,16	1,48
60	2,95	0,16	0,02	2,98	6,10	0,50	0,06	1,40
68	2,38	0,06	–0,04	2,67	2,74	–0,02	–0,13	1,26
76	3,06	0,23	0,13	2,99	5,07	0,71	0,12	1,58
77	3,25	0,40	0,32	3,04	5,44	0,24	0,12	1,70
78	3,23	0,53	–0,04	2,69	2,60	0,59	0,22	0,14
89	4,09	3,35	3,88	4,57	5,25	3,28	3,32	4,63
133	1,18	0,18	0,28	1,43	1,00	0,66	0,40	0,38
152	2,97	0,12	0,22	3,15	3,41	0,24	0,00	1,34
172	: : : :	3,74	5,68	4,45	5,01	3,84	: : : :	4,89
176	: : : :	3,60	3,37	5,45	5,00	3,00	: : : :	: : : :
182	3,59	2,36	2,15	1,83	5,44	2,14	1,85	5,02
214	1,45	0,18	–0,02	1,42	0,89	0,20	–0,06	1,46
521/57	0,18	0,07	0,01	0,73	0,07	0,13	0,07	1,26
690	2,87	0,23	0,07	3,03	5,62	0,10	0,29	0,07
714	2,98	0,31	0,05	2,95	4,46	0,00	–0,19	0,05
725	2,59	–0,02	0,05	2,86	2,77	0,56	0,22	0,15
726	2,90	–0,06	0,05	2,91	5,06	0,16	–0,09	1,54
798	0,61	0,07	0,11	0,47	0,31	0,10	–0,01	1,46
799	0,76	0,13	–0,04	1,39	1,02	0,29	–0,11	1,43
801	----	----	----	----	4,08	----	----	----
804	2,16	1,10	0,81	0,44	0,95	0,81	0,77	1,56
806	----	----	----	----	5,79	----	----	----
810	----	----	----	----	3,95	----	----	----
900	3,30	2,05	2,24	2,27	4,53	2,68	2,32	4,14
904	: : : :	2,12	2,29	2,58	5,36	: : : :	2,32	4,14
907	3,19	1,86	2,42	1,90	5,34	: : : :	2,34	3,74
908	2,94	2,33	1,90	2,48	4,84	2,33	2,40	3,42
909	2,59	0,19	0,12	2,98	5,85	0,36	0,04	1,60
1114	0,19	0,11	0,03	0,83	0,85	0,20	–0,12	1,29

Tableau 16 (log de l'inverse de l'efficacité d'étalement)

Discussion.

L'examen du tableau précédent permet de tirer un certain nombre de conclusions. Nous laissons provisoirement de côté le « Phagus polonus », qui n'a pas la même origine que les autres, et qui nous servira plus tard de point de comparaison.

Rappelons que sur les 7 phages restants, 3 d'entre eux (1, 2 et 3) sont des mélanges, c'est-à-dire qu'ils sont des préparations différentes du phage « Cossonay » total, tandis que les autres sont des phages purs, descendant d'une seule plage par plusieurs passages.

Nous allons commenter les résultats horizontalement, c'est-à-dire examiner les chiffres trouvés pour chaque souche avec les 7 bactériophages. Nous donnerons en outre, pour chaque système phage/hôte, la morphologie des plages.

Souche 17 : la souche 17 étant prise comme référence pour la détermination de l'efficacité d'étalement relative, les résultats obtenus sont les mêmes pour tous les phages « Cossonay ».

Morphologie des plages : 1) 1-4 mm (légères cultures secondaires) ; 2) 0,5-4 mm (cultures secondaires) ; 3) 0,5-3 mm (les plages ont un centre et un bord clairs, avec une culture secondaire en anneau) ; 4) plages de 4 mm en majorité, rares plages de 2 mm (légères cultures secondaires) ; 5) 0,2-3 mm (plages claires) ; 7) 0,5 (rares) — 3 mm (cultures secondaires) ; 8) 0,5 (rares) — 3 mm (les grandes plages ont de légères cultures secondaires en anneau).

Souche 55/b : l'action des différentes préparations de phage « Cossonay » semble s'exercer de deux façons différentes : les phages 2, 3, 7 et 8 ont un titre du même ordre de grandeur que celui qui est obtenu avec la souche de référence, tandis que les phages 1, 4 et 5 ont un titre beaucoup plus bas. Si l'on se reporte aux pages 67 et 80, où sont donnés les modes de préparation de chacun des phages, on s'aperçoit que les phages 2, 3, 7 et 8 ont été préparés au moyen de la souche 909, tandis que les 3 autres ont été préparés avec la souche 521/57.

Morphologie des plages : 1) 0,2-1 mm ; 2) 1-4 mm ; 3) 0,5-2 mm ; 4) 1-4 mm ; 5) 0,5 mm ; 7) 0,5 (rares) - 3 mm ; 8) 0,5-1 mm. Toutes les plages formées sur cette souche ont de légères cultures secondaires.

Souche 59 : la plus haute efficacité d'étalement est obtenue avec le phage 8 (Co-k). La relation entre l'efficacité d'étalement et la souche employée pour la préparation du phage n'est pas aussi marquée que pour la souche précédente. Nous voyons une très forte différence d'efficacité d'étalement entre les phages Co-p IV et Co-g IV ; cette différence est la plus forte que nous observerons pour toutes les souches ; d'autre part, ainsi que nous l'avons déjà dit, la plus basse efficacité d'étalement de tous nos essais est obtenue avec la souche 59 et le phage Co-p IV. L'efficacité d'étalement d'un mélange de phages dépend de l'efficacité d'étalement de chacun des phages présents dans le mélange, et de leur proportion respective. S'il est normal que l'efficacité d'étalement du mélange soit comprise entre celle du phage le plus actif et celle du phage le moins actif, comme c'est le cas pour le phage 1, il faut attribuer à un phénomène particulier le fait que les phages 2 et 3 aient une efficacité d'étalement plus forte que celle du phage pur le plus actif. On remarque également que les phages 7 et 8 ont une efficacité d'étalement plus forte que le phage 4. Or les phages 2, 3, 7 et 8 ont été propagés sur la souche 909. Nous aurons l'occasion de faire des observations analogues à propos d'autres souches.

Morphologie des plages : 1) 0,2-4 mm (cultures secondaires) ; 2) 0,1-3 mm (cultures secondaires dans quelques plages) ; 3) 1-3 mm (cultures secondaires dans environ 50 % des plages) ; 4) 0,5 (rares) — 3 mm ; 5) 0,1-1 mm ; 7) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 8) 1-3 mm.

Souche 60 : quoique les chiffres obtenus soient passablement différents de ceux trouvés pour la souche 59, on remarque que l'allure générale reste la même : efficacité d'étalement minimum pour le phage 5, maximum pour les phages préparés avec la souche 909.

Morphologie des plages : 1) 2-5 mm ; 2) 1-3 mm (cultures secondaires) ; 3) 1-4 mm ; 4) 0,5 (rares) — 4 mm ; 5) 0,5-1 mm ; 7) 1-6 mm (légères cultures secondaires) ; 8) 2-5 mm, rares de 0,5 mm.

Souche 68 : les 4 phages préparés avec la souche 909 donnent des efficacités d'étalement égales à celle de la souche de référence. Quant aux phages préparés avec la souche 521/57, ils donnent des efficacités d'étalement du même ordre de grandeur. En comparant les résultats obtenus avec cette souche et ceux qui ont été donnés pour la souche 55/b, on s'aperçoit qu'il y a une concordance remarquable pour la plupart des préparations de phage « Cossonay ».

Morphologie des plages : 1) 0,5-3 mm ; 2) 1-4 mm ; 3) 0,5-2 mm ; 4) 0,5 (rares) - 4 mm ; 5) 0,2 mm ; 7) 0,5 (rares) - 3 mm ; 8) 0,5 (rares) - 3 mm.

Souche 76 : on remarque à nouveau l'efficacité d'étalement élevée obtenue avec les phages préparés sur la souche 909. Par contre, l'efficacité d'étalement est de 1/1000 avec les phages 1 et 4, et de 1/100'000 seulement avec le phage 5.

Morphologie des plages 1) 1-3 mm ; 2) 3 mm (environ 50 % des plages ont des cultures secondaires peu importantes) ; 3) 5 mm (50 % des plages ont de légères cultures secondaires) ; 4) 1-3 mm ; 5) 0,1-2 mm ; 7) 1-5 mm ; 8) 0,5 (rares) - 4 mm.

Souche 77 : les efficacités d'étalement obtenues avec cette souche sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons notées pour la souche 76, et les mêmes observations peuvent être faites. Dans le cas de la souche 77, les efficacités d'étalement sont légèrement plus faibles, sauf avec le phage Co-e.

Morphologie des plages : 1) 2 mm ; 2) 0,5-2 mm ; 3) 0,5-1 mm ; 4) 2 mm ; 5) 0,1-1 mm ; 7) 4 mm ; 8) 2 mm.

Souche 78 : on remarque de nouveau que les efficacités d'étalement les plus hautes sont obtenues avec les phages préparés au moyen de la souche 909. L'efficacité d'étalement est la même pour Co-p IV et Co-g IV.

Morphologie des plages : 1) 2-6 mm (cultures secondaires) ; 2) 3-5 mm (cultures secondaires) ; 3) 3-4 mm (cultures secondaires abondantes ; comptage des plages difficile) ; 4) 2-4 mm (cultures secondaires) ; 5) 1-2 mm (légères cultures secondaires) ; 7) 1-7 mm ; 8) 1-8 mm.

Souche 89 : l'efficacité d'étalement la plus basse est obtenue avec le phage Co-p IV. Pour aucun des phages « Cossonay », on n'obtient d'efficacité d'étalement du même ordre de grandeur que l'efficacité d'étalement de référence. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les phages préparés sur la souche 909.

Morphologie des plages : 1) 0,2-1 mm ; 2) 0,2-0,5 mm ; 3) 0,1-1 mm ; 4) 0,2-1 mm ; 5) 0,1 mm ; 7) 1-2 mm ; 8) 1 mm.

Souche 133 : l'efficacité d'étalement la plus basse est obtenue avec le phage Co-g IV ; les meilleurs résultats sont donnés par les phages préparés au moyen de la souche 909.

Morphologie des plages : 1) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 2) 2-3 mm (le centre de la plupart des plages est clair, tandis que le pourtour est voilé par une culture secondaire ; certaines plages sont troubles dans leur totalité) ; 3) 0,5-4 mm (même phénomène que pour le phage 1, visible sur les grandes plages seulement) ; 4) 2-4 mm (fortes cultures secondaires) ; 5) 0,1 mm (plages claires) ; 7) 1-3 mm (cultures secondaires ; centres des plages clairs) ; 8) 1-3 mm (cultures secondaires abondantes ; centres des plages clairs).

Souche 152 : l'efficacité d'étalement la plus basse est obtenue avec le phage Co-p IV. L'efficacité d'étalement est meilleure pour les phages préparés avec la souche 909 ; le phage Co-k atteint même le maximum.

Morphologie des plages : 1) 1-4 mm (légères cultures secondaires) ; 2) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 3) 0,2-2 mm (légères cultures secondaires) ; 4) 0,5 (rares) - 3 mm ; 5) 0,2-3 mm ; 7) 0,2-0,5 mm ; 8) 0,5-3 mm.

Souche 172 : tous les titres mesurés sont plus bas que le titre obtenu avec la souche de référence ; les phages préparés avec la souche 909 ne donnent pas de meilleurs résultats que les autres ; au contraire, l'efficacité d'étalement est particulièrement faible avec le phage 3, préparé précisément avec cette souche 909.

Morphologie des plages : 1) aucune plage observée, malgré les essais répétés à diverses dilutions ; 2) 0,5-1 mm (fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 3) 0,1-1 mm (fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 4) 0,5 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 5) 1 mm (plages claires) ; 7) 0,1-1 mm (très fortes cultures secondaires ; numération particulièrement difficile) ; 8) aucune plage observée, malgré des essais répétés à diverses dilutions.

Souche 176 : l'efficacité d'étalement la plus faible est obtenue avec le phage Co-g IV. Les phages préparés avec la souche 909 ont une meilleure efficacité d'étalement.

Morphologie des plages : 1) aucune plage observée, malgré des essais répétés à diverses dilutions ; 2) 0,5-1 mm ; 3) 0,5 mm ; 4) 0,1 mm (cultures secondaires abondantes ; numération difficile) ; 5) 0,5-1 mm (fortes cultures secondaires) ; 7) 0,1-1 mm ; 8) aucune plage observée, malgré des essais répétés à diverses dilutions.

Souche 182 : il s'agit d'une souche peu sensible, le titre le plus haut étant obtenu avec le phage Co-g IV ; ce titre est cependant plus de 60 fois plus faible que le titre de référence. On ne remarque pas de différences significatives d'activité entre les phages préparés avec la souche 909 et les autres.

Morphologie des plages : 1) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 2) 1-2 mm (cultures secondaires) ; 3) 1-2 mm (fortes cultures secondaires) ; 4) 0,5 (rares) — 2 mm (cultures secondaires) ; 5) 0,2-1 mm ; 7) 0,5 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 8) 0,5 (rares) — 2 mm (fortes cultures secondaires).

Souche 214 : souche sensible d'une manière générale. L'efficacité d'étalement la plus élevée est obtenue avec les phages Co-st et Co-k. Les autres phages préparés avec la souche 909 ont aussi une efficacité d'étalement élevée. Bien que les valeurs obtenues ne soient pas exactement les mêmes, on peut comparer cette souche à la souche 133, qui réagit à peu près de la même façon aux divers phages « Cossonay ».

Morphologie des plages : 1) 1-4 mm ; 2) 1-3 mm ; 3) 0,5-3 mm ; 4) 1 (rares) - 4 mm ; 5) 0,5-1 mm ; 7) 3 mm ; 8) 0,5 (rares) - 3 mm.

Souche 521/57 : cette souche est très sensible à la plupart des phages. On note que le phage le moins actif est Co-g IV. Il n'y a pas de différences significatives d'efficacité d'étalement entre les phages préparés avec la souche 909 et les autres.

Morphologie des plages : 1) 0,5-4 mm ; 2) 0,1-2 mm ; 3) 0,2-3 mm ; 4) 0,5 (rares) — 2 mm ; 5) 0,1-0,5 mm ; 7) 0,2 (rares) — 3 mm ; 8) 0,2 (rares) — 3 mm.

Souche 690 : la sensibilité de cette souche est médiocre pour les phages préparés avec la souche 521/57, tandis qu'elle s'approche du maximum pour les phages préparés avec la souche 909. La même allure générale de la sensibilité a déjà été observée avec les souches 76 et 77.

Morphologie des plages : 1) 1-3 mm ; 2) 1-3 mm : 3) 1-5 mm ; 4) 2-3 mm ; 5) 1-2 mm ; 7) 1-4 mm ; 8) 1-5 mm.

Souche 714 : on remarque que les phages préparés avec la souche 909 donnent une efficacité d'étalement supérieure à celle obtenue avec les autres phages. La souche n'est pas très sensible à Co-g IV ; elle l'est encore moins à Co-p IV. On note d'autre part que cette souche est plus sensible à Co-k que ne l'est la souche 17, utilisée comme référence. Il ne faut pas oublier que les chiffres que nous donnons représentent l'efficacité d'étalement relative et non pas absolue, cette dernière étant toujours inférieure à la valeur relative ; il n'est donc pas anormal de trouver un chiffre de cette valeur.

Morphologie des plages : 1) 1-5 mm ; 2) 0,5-5 mm ; 3) 1-6 mm ; 4) 1-5 mm ; 5) 1-3 mm ; 7) 1-5 mm ; 8) 1-3 mm.

Souche 725 : cette souche est relativement peu sensible, et elle a la même efficacité d'étalement pour Co-p IV et Co-g IV (propriété qu'elle partage avec les souches 68 et 78). L'efficacité d'étalement est meilleure pour les phages préparés avec la souche 909.

Morphologie des plages : 1) 2 mm ; 2) 0,5-1 mm ; 3) 1-3 mm ; 4) 2 mm ; 5) 0,5 mm ; 7) 2-3 mm ; 8) 2-3 mm.

Souche 726 : cette souche ressemble passablement à la souche 725, mais elle est plus de 100 fois moins sensible à la variété Co-p IV.

Morphologie des plages : 1) 1-6 mm ; 2) 3-6 mm ; 3) 2-5 mm ; 4) 4-6 mm ; 5) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 7) 0,5 mm (rares) - 4 mm ; 8) 1-4 mm.

Souche 798 : l'allure générale de la sensibilité de cette souche peut se comparer à celle de la souche 521/57, mais on remarque cependant quelques différences. La concordance est bonne pour les phages 2, 3, 7 et 8. Par contre 798 est plus sensible à Co-g IV et moins sensible à Co-27. 6. 58 et à Co-p IV que 521/57.

Morphologie des plages : 1) 2-5 mm (cultures secondaires très abondantes ; numération difficile à faire) ; 2) 1-5 mm (cultures secondaires) ; 3) 0,5-3 mm (cultures secondaires) ; 4) 1-3 mm (cultures secondaires) ; 5) 0,5-1,5 mm (cultures secondaires) ; 7) 0,5 (rares) — 5 mm (cultures secondaires) ; 8) 1-5 mm (cultures secondaires).

Souche 799 : d'une manière générale, la souche est assez sensible aux phages « Cossonay ». L'efficacité d'étalement est la meilleure avec les phages préparés au moyen de la souche 909. Cette efficacité d'étalement atteint même le maximum avec les phages 3 et 8.

Morphologie des plages : 1) 0,1-3 mm ; 2) 0,1-3 mm ; 3) 0,5-2 mm ; 4) 0,2 (rares) - 3 mm ; 5) 0,1 - 0,5 mm (en outre, environ 0,8 % des plages ont 1 mm et plus) ; 7) 0,5 (rares) — 3 mm ; 8) 0,5 (rares) — 3 mm.

Souche 801 : cette souche n'est sensible qu'au phage Co-p IV, avec une efficacité d'étalement assez basse.

Morphologie des plages : 5) 1-3 mm.

Souche 804 : cette souche est assez sensible à toutes les variétés de phage « Cossonay ». L'efficacité d'étalement obtenue avec les phages préparés au moyen de la souche 909 n'est pas meilleure que celle qui est obtenue avec les autres phages.

Morphologie des plages : 1) 0,5-2 mm ; 2) 1-4 mm ; 3) 0,5-3 mm ; 4) 0,5 (rares) — 3 mm ; 5) 0,5 (rares) — 2 mm ; 7) 1-5 mm ; 8) 0,5 (rares) — 3 mm.

Seule parmi les 32 souches étudiées dans cette série d'essais, la souche 804 pousse relativement lentement. Il faut attendre une semaine pour avoir une culture en bouillon assez abondante pour faire une titration. A ce moment, la culture en bouillon n'a pas de voile, mais elle est parfaitement homogène et présente des ondes moirées tout-à-fait comparables à celles qu'on observe dans une culture de bacilles typhiques par exemple. La lecture de la titration peut se faire au bout de 4 jours.

Souche 806 : cette souche n'est sensible qu'au phage Co-p IV, avec une efficacité d'étalement très faible.

Morphologie des plages : 5) 0,5 mm.

Souche 810 : cette souche n'est sensible qu'au phage Co-p IV, avec une efficacité d'étalement comparable à celle de la souche 801.

Morphologie des plages : 5) 2 mm.

Souche 900 : cette souche est sensible d'une façon à peu près égale à tous les phages « Cossonay », sauf à Co-p IV, dont l'efficacité d'étalement est passablement plus faible. La souche n'est pas plus sensible aux phages préparés avec la souche 909 qu'à ceux qui ont été préparés avec 521/57.

Morphologie des plages : 1) 0,2-1 mm (cultures secondaires) ; 2) 2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 3) 1-2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 4) 1 mm environ (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 5) 0,1-1 mm (cultures secondaires ; numération difficile) ; 7) 1 mm environ (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 8) 1 mm environ (fortes cultures secondaires ; numération difficile).

Souche 904 : l'allure générale de la sensibilité de cette souche ressemble à celle de la souche 900. Mais la souche 904 ne donne pas de plages visibles avec les phages 1 et 7, malgré de nombreux essais. Il est permis de supposer que des cultures secondaires très abondantes ont masqué les plages.

Morphologie des plages : 1) pas de plages visibles ; 2) 1-2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 3) 1-2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 4) 2 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 5) 0,1-1 mm (cultures secondaires) ; 7) pas de plages visibles ; 8) 2 mm environ (très fortes cultures secondaires ; numération difficile).

Souche 907 : la sensibilité de cette souche est assez voisine de celle de la souche 904. La souche ne donne pas de plages avec Co-e, mais elle en donne avec le phage Co-27. 6. 58, ce qui permet de supposer que l'hypothèse émise à propos de la souche 904 est fondée.

Morphologie des plages : 1) 0,1-2 mm (cultures secondaires) ; 2) 0,5-2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 3) 1-2 mm (abondantes cultures secondaires) ; 4) 2 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 5) 0,1-1 mm (cultures secondaires) ; 7) pas de plages visibles ; 8) 2 mm environ (très fortes cultures secondaires ; numération difficile).

Souche 908 : cette souche est assez peu sensible aux phages « Cossonay » ; l'efficacité d'étalement avec les phages préparés au moyen de la souche 909 n'est pas meilleure que l'efficacité d'étalement obtenue avec les autres phages.

Morphologie des plages : 1) 0,1-1 mm ; 2) 0,1-1 mm ; 3) 0,5-1 mm (légères cultures secondaires) ; 4) 0,5-1 mm (cultures secondaires) ; 5) 0,1-0,5 mm ; 7) 0,1-2 mm ; 8) 0,2-2 mm.

Souche 909 : souche assez peu sensible aux phages préparés avec la souche 521/57, beaucoup plus sensible aux autres. La sensibilité de cette souche ressemble à celle de la souche 690 et à celle de la souche 60.

Morphologie des plages : 1) 0,5-3 mm ; 2) 1 (rares) - 5 mm ; 3) 5 mm ; 4) 1 (rares) — 4 mm ; 5) 0,5 mm ; 7) 0,5 (rares) — 6 mm ; 8) 1-5 mm.

Souche 1114 : la sensibilité de cette souche aux divers phages « Cossonay » est comparable à celle de la souche 521/57. L'efficacité d'étalement est meilleure avec les phages préparés au moyen de la souche 909.

Morphologie des plages : 1) 0,2-5 mm ; 2) 0,5-2 mm ; 3) 0,5-2 mm ; 4) 0,2 (rares) - 3 mm ; 5) 0,1-0,5 mm (en outre, environ 2 % des plages ont un diamètre supérieur à 1 mm) ; 7) 0,2 (rares) - 5 mm ; 8) 1-3 mm.

Les différences que nous avons notées entre les résultats obtenus pour les souches 521/57, 798 et 1114, et dont nous avons esquissé une explication à la page 80, nécessitent encore quelques remarques.

L'histoire de la souche ATCC 607, qui est à l'origine des trois variantes que nous avons essayées, est intéressante et a donné lieu à de nombreux commentaires.

Une étude sur cette souche a été publiée par Tobie en 1948 [**58**]. L'origine de la souche demeure assez obscure. Il semble cependant qu'elle a été apportée aux Etats-Unis en 1888 déjà. Quoiqu'elle ait été pendant longtemps considérée comme une souche de bacilles tuberculeux authentiques, on n'a jamais été sûr de sa provenance. En 1932, Hastings et McCarter [**87**] ont attiré l'attention sur les anomalies présentées par cette souche et sur les grandes différences existant entre les propriétés des bacilles tuberculeux humains et celles de cette souche ATCC 607. La souche en question pousse en effet sur les milieux ordinaires (bouillon, gélose, etc.) en 48 heures, et elle n'est pas pathogène pour le cobaye. Comme il est de plus douteux que cette souche ait été isolée d'une lésion humaine, il semble raisonnable de ne plus l'appeler *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. Or, malgré l'avertissement de Hastings et McCarter, divers auteurs ont continué à utiliser cette souche en croyant manipuler des bacilles tuberculeux authentiques. Des études détaillées sur les propriétés de cette souche ont été faites par différents chercheurs, et les résultats obtenus ont montré qu'elle se rapproche beaucoup de *Mycobacterium smegmatis*. Cependant personne n'ose encore l'appeler de ce nom. Les derniers catalogues de l'American Type Culture Collection se contentent de l'indication suivante : « Nonvirulent, rapidly growing strain. Received as Koch's original culture of *B. tuberculosis* ».

Signalons encore que Hastings et McCarter [**87**] ont fait remarquer que le même doute plane sur la souche ATCC 599 (qui porte le N° 799 à la collection de Lausanne), souche qui a longtemps été considérée comme une souche de bacilles tuberculeux bovins. Elle possède les mêmes caractères culturaux que la souche ATCC 607.

Quelle que soit l'origine véritable de la souche ATCC 607, elle a été fort employée, et plus particulièrement ces dernières années, depuis la découverte de mycobactériophages, qui sont presque tous capables de la lyser. Par exemple, sur les 12 phages utilisés par Froman [**13**] dans ses essais de typisation des bacilles acido-alcoolo-résistants non tuberculeux, un seul d'entre eux est incapable de lyser la souche ATCC 607.

Nous avons manipulé cette souche sous plusieurs formes différentes (voir page 80). Comme l'hétérogénéité de cette souche a été prouvée, et qu'on sait que la sensibilité des différentes filières n'est pas la même que celle de la souche totale, il est compréhensible que 521/57 ne donne pas les mêmes résultats que 798 et 1114.

Par contre, les différences observées entre 798 et 1114 sont moins facilement explicables. Nous avons déjà proposé l'explication qui nous paraît la plus vraisemblable : les souches ont été repiquées un grand nombre

de fois, et il est possible que l'une ou l'autre des filières composant la souche totale se soit développée plus que les autres.

Il n'est du reste pas du tout certain que la souche 521 totale soit semblable à la souche originale. Il est probable que des essais faits sur la même souche, mais conservée dans les laboratoires différents (cette souche est très répandue), donneraient des résultats autres que ceux que nous avons obtenus.

Nous avons montré l'hétérogénéité de la souche 521 vis-à-vis du phage « Cossonay », mais il est possible que les filières isolées diffèrent encore les unes des autres par un certain nombre de caractères, tels que la rapidité de croissance (déjà mentionnée plus haut), la sensibilité aux antibiotiques, la sensibilité à la chaleur, etc.

D'autre part, on sait qu'au cours de la lyophilisation, un certain nombre de bactéries sont tuées. Ce nombre varie beaucoup avec les conditions dans lesquelles est faite l'opération ; il varie également d'une souche à l'autre. Il est donc permis de supposer (l'expérience n'a jamais été faite à notre connaissance) que ce nombre peut varier, pour une même souche, avec les filières, les unes résistant mieux à la lyophilisation que les autres. Or la lyophilisation est devenue depuis quelques années un moyen très commode de conservation des bactéries, employé par presque toutes les collections, et en particulier par l'American Type Culture Collection et le Centre International de Collections de Cultures de Lausanne.

La souche ATCC 607 a donc été lyophilisée un très grand nombre de fois, avec des appareils et des techniques certainement différents les uns des autres. Il est donc parfaitement possible que ces opérations successives aient fait une sorte de sélection des éléments les plus résistants à la lyophilisation, ce qui expliquerait pourquoi les différentes subcultures de cette souche ne sont pas identiques.

La différence la plus frappante entre la souche 798 d'une part et les souches 521/57 et 1114 d'autre part est l'existence de cultures secondaires parfois abondantes lors des numérations faites sur la souche 798. Dans le tableau 6, nous avons indiqué les résultats des numérations faites sur les différentes filières de 521, mais nous n'avons donné ni le diamètre ni l'aspect macroscopique des plages, qui ne nous intéressaient pas à ce moment. Nous avons cependant noté ces caractéristiques lors des essais. Parmi les 100 filières examinées, une seule d'entre elles, 521/95, donne des cultures secondaires. Il est probable que cette filière s'est plus développée que les autres dans la souche 798, alors qu'elle est très rare dans la souche 521 et probablement aussi dans la souche 1114.

De telles observations doivent attirer l'attention sur ce phénomène encore trop peu connu que sont les mélanges de germes. Comment s'étonner que des auteurs différents, employant pourtant les mêmes souches, les mêmes techniques, les mêmes milieux de culture, n'obtiennent pas des résultats toujours identiques, quand, dans le seul exemple que nous venons de donner, des différences importantes sont notées entre des souches qui portent le même nom, qui proviennent de la même collection et qui sont manipulées par le même expérimentateur.

Nous avons donné, dans les tableaux précédents, les résultats des titrations effectuées avec un certain nombre de préparations de phage « Cossonay » et avec le « Phagus polonus » sur 32 souches sensibles. Ces essais avaient tout d'abord pour but de prouver par une méthode biologique que les phages Co-p IV et Co-g IV sont bien différents. Nous avons montré que l'hypothèse était fondée.

Mais un des buts que nous nous étions fixé au début de ce travail était l'obtention de phages nouveaux pouvant servir à la typisation des mycobactéries. Nous examinerons ce problème ultérieurement. Nous devons donner auparavant quelques autres résultats, et tout d'abord indiquer la morphologie des plages observées lors des titrations faites avec le « Phagus polonus » sur 32 souches sensibles.

PHAGUS POLONUS : morphologie des plages.

17) 0,5-3 mm (les plages ont un centre et un bord clairs, et des cultures secondaires en anneau) : 55/b) 1-4 mm (légères cultures secondaires) ; 59) 3-4 mm (légères cultures secondaires) ; 60) 2-5 mm (légères cultures secondaires) ; 68) 0,5 (rares - 3 mm ; 76) 2-5 mm ; 77) 0,5 (rares) - 2 mm ; 78) 2-6 mm ; 89) 1 mm (fortes cultures secondaires) ; 133) 1-4 mm (cultures secondaires) ; 152) 1-3 mm (cultures secondaires) ; 172) 1 mm (fortes cultures secondaires) ; 176) pas de plages visibles ; 182) 0,5-1 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 214) 1-3 mm (cultures secondaires) ; 521/57) 0,1-3 mm ; 690) 2-4 mm (légères cultures secondaires) ; 714) 2-5 mm ; 725) 2-3 mm ; 726) 1-3 mm ; 798) 1-6 mm (cultures secondaires ; les remarques faites à la page 93 sont confirmées par cette observation) ; 799) 0,5-2 mm ; 804) 1-5 mm ; 900) 0,5-1 mm (fortes cultures secondaires) ; 904) 0,5-1 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 907) 1 mm (très fortes cultures secondaires ; numération difficile) ; 908) 0,2-2 mm (légères cultures secondaires) ; 909) 1-5 mm ; 1114) 1-5 mm.

La présence de grandes et petites plages mélangées sur les plaques de 521/57 ensemencées avec du « Phagus polonus » fait penser au phénomène observé avec le phage « Cossonay » total. Nous avons voulu tenter une séparation, afin de voir si ces différences de diamètres étaient dues à un mélange de phages comme dans le cas du bactériophage « Cossonay », ou simplement à des retards de croissance des plages, conséquence d'infections tardives des bactéries par les phages.

Pour cela, nous avons employé la même technique que celle qui a déjà été décrite : isolement de plages de diamètres différents, filtration, dilution, numération de chaque dilution, cette série d'opérations successives étant répétée plusieurs fois si nécessaire.

Les essais, tentés à deux reprises, n'ont pas permis d'isoler des variétés différentes, donnant l'une des grandes plages et l'autre des petites, comme ç'avait été le cas pour le phage « Cossonay ». En effet, les repiquages successifs de plages très petites ont toujours montré la présence, souvent en grande majorité, de plages de grand diamètre, et les repiquages des grandes plages ont toujours montré la présence de petites plages. Il est donc des plus probables que le « Phagus polonus » est un phage pur. Nous disons bien « des plus probables », car s'il est facile dans certains cas de montrer l'existence d'un mélange, il est difficile de prouver qu'une souche est pure. Il se pourrait en effet soit

que le « Phagus polonus » contienne des variétés différant l'une de l'autre par d'autres caractères que la morphologie des plages, soit au contraire qu'il contienne des variétés donnant des plages de morphologie différentes, mais dont l'une n'existerait qu'en très faible proportion. Pour isoler cette variété, il faudrait faire un très grand nombre de repiquages de plages isolées.

d) **Sensibilité à la chaleur.**

Nous avons fait un certain nombre d'essais pour déterminer la sensibilité à la chaleur des deux variétés du phage « Cossonay ».

Les expériences ont été faites avec les phages Co-p IV et Co-g IIIa, employés à une concentration de $1{,}5 \times 10^6$/cc. Les dilutions ont été faites dans le tampon suivant :

KH_2PO_4	13,6	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2	g
$Ca(NO_3)_2$	0,01	g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,0005	g
eau distillée	1000	g

On ajoute KOH dilué jusqu'au pH 7,0, puis on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°.

Les phages dilués sont répartis dans des tubes étroits à raison de 1 cc par tube. Il faut 20 tubes par sorte de phage et par température. Les essais ont été faits successivement à 65° et à 60°.

Tous les tubes sont immergés en même temps dans un bain-marie à la température voulue, puis, de 3 en 3 minutes, un tube de chaque variété est sorti puis plongé immédiatement dans un bain d'eau glacée jusqu'à la fin de l'opération. La titration du phage chauffé se fait approximativement, selon la technique déjà décrite, par dépôt d'une goutte de chaque tube à la surface d'une plaque de gélose Bordet-Gengou recouverte de gélose molle contenant le germe sensible (521/57). Les résultats sont lus au bout de 48 heures.

Nous les donnons dans les deux tableaux ci-dessous.

Temps	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Temps*	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*
0 (témoin)	LC	LC	30'	—	—
3'	—	+	33'	—	—
6'	—	—	36'	—	—
9'	—	—	39'	—	—
12'	—	—	42'	—	—
15'	—	—	45'	—	—
18'	—	—	48'	—	—
21'	—	—	51'	—	—
24'	—	—	54'	—	—
27'	—	—	57'	—	—

Tableau 17 — Essais à 65°

Temps	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Temps*	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*
0 (témoin)	LC	LC	30'	—	—
3'	—	Lc	33'	—	+
6'	—	+++	36'	—	+
9'	—	++	39'	—	—
12'	—	++	42'	—	—
15'	—	++	45'	—	—
18'	—	+	48'	—	—
21'	—	+	51'	—	—
24'	—	+	54'	—	—
27'	—	+	57'	—	—

Tableau 18 — Essais à 60°

D'une façon générale, on sait que les bactériophages sont plus résistants en bouillon que dans de l'eau physiologique ou dans du tampon. Nous avons fait une série d'essais en bouillon pour vérifier cette règle.

Pour cette série d'expériences, nous avons légèrement modifié la technique. Au lieu de mettre tous les tubes à la fois dans le bain-marie et de les sortir à intervalles réguliers, nous les avons mis dans le bain-marie à intervalles réguliers et plongés dans un bain d'eau glacée tous à la fois à la fin de l'opération.

Une première série d'essais à 60° a montré que le phage est effectivement plus stable en bouillon qu'en tampon, car à la fin de l'expérience, il subsistait encore des plages pour les phages des deux sortes.

Une deuxième série d'essais à 60°, où les tubes étaient mis toutes les 5 minutes, a donné les résultats suivants :

Temps	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Temps*	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*
0 (témoin)	LC	LC	55'	++	+
10'	LC	LC	60'	++	++
15'	LC	LC	1 h. 05'	+	++
20'	LC	LC	1 h. 10'	+	++
25'	Lc	Lc	1 h. 15'	++	—
30'	+++	Lc	1 h. 20'	—	—
35'	+++	Lc	1 h. 25'	—	—
40'	+++	+++	1 h. 30'	—	+
45'	+++	++	1 h. 35'	—	++
50'	+++	++	1 h. 40'	—	—

Tableau 19 — Essais à 60° en bouillon

La résistance des deux phages en bouillon à 65° a également été étudiée. Les tubes ont été mis au bain-marie toutes les minutes. Les résultats sont les suivants :

Temps	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Temps*	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*
0 (témoin)	LC	LC	10'	—	+
1'	Lc	Lc	11'	—	+
2'	+++	+++	12'	—	—
3'	+++	++	13'	—	—
4'	++	+	14'	—	—
5'	+	+	15'	—	—
6'	+	+	16'	—	—
7'	—	—	17'	—	—
8'	—	—	18'	—	—
9'	—	—	19'	—	—

Tableau 20 — Essais à 65° en bouillon

Le tableau suivant indique les résultats obtenus à 70°, les tubes étant mis au bain-marie toutes les 15 secondes.

Temps	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*	*Temps*	*Co-p IV*	*Co-g IIIa*
0 (témoin)	LC	LC	2' 30"	—	—
15"	LC	LC	2' 45"	—	—
30"	LC	LC	3'	—	—
45"	Lc	Lc	3' 15"	—	—
1'	+++	++	3' 30"	—	—
1' 15"	++	++	3' 45"	—	—
1' 30"	—	—	4'	—	—
1' 45"	—	—	4' 15"	—	—
2'	—	—	4' 30"	—	—
2' 15"	—	—	4' 45"	—	—

Tableau 21 — Essais à 70° en bouillon

Discussion.

Les résultats sont différents selon que les essais sont faits dans du tampon ou dans du bouillon. D'une part, on note que les deux variétés de phage « Cossonay » sont plus sensibles dans le tampon que dans le bouillon, et d'autre part on remarque une différence de sensibilité entre les deux variétés quand les essais sont faits en tampon. La différence

est peu marquée à 65°, où la variété Co-p IV est détruite en 3 minutes, alors qu'il subsiste encore quelques éléments de la variété Co-g IIIa. Par contre, la différence est nette à 60° ; il faut en effet 3 minutes seulement pour détruire totalement le phage Co-p IV, alors qu'il faut au moins 39 minutes pour détruire totalement le phage Co-g IIIa.

Quand les essais sont faits en bouillon, il ne semble pas que les légères différences notées entre les 2 variétés soient significatives. On note d'autre part quelques résultats curieux. En effet, on n'obtient plus de plages avec les deux variétés au bout d'une heure vingt minutes à 60°, mais il y a encore du phage Co-g IIIa dans les tubes qui sont restés 10 et 15 minutes de plus à cette température. Ces anomalies peuvent s'expliquer facilement. Nous avons pris soin d'agiter régulièrement les tubes placés dans le bain-marie, afin que l'effet de la chaleur se fasse sentir dans toute la masse du bouillon, mais il est pratiquement impossible d'agiter tous les tubes de la même façon, malgré le soin qu'on apporte à cette opération. Il est des plus probables que ces différences d'agitation, et par conséquent d'exposition à la chaleur, sont la cause des quelques anomalies observées.

Théoriquement, des résultats plus précis pourraient être obtenus en mettant la quantité totale de phage dans un seul récipient, et en faisant des prélèvements à intervalles réguliers. Mais il se produirait un refroidissement à chacun de ces prélèvements, refroidissement dont l'effet sur les résultats serait d'autant plus grand que la température est plus élevée, surtout si les prélèvements se font à des intervalles rapprochés.

De toute façon, on ne peut pas s'attendre à une très grande précision dans ces essais, parce que l'influence de la température dépend non seulement du milieu dans lequel les essais sont faits, mais encore de différents autres facteurs, tels que l'acidité du milieu, sa teneur en oxygène, etc.

On peut dire en résumé que les deux variétés de phage « Cossonay » sont totalement détruites en 39 minutes à 60° et en 6 minutes à 65° quand les phages sont en suspension dans du tampon, et qu'il faut plus d'une heure et demie à 60°, 12 minutes à 65° et une minute et demie à 70° pour obtenir le même résultat quand les phages sont en suspension dans du bouillon.

e) **Filtrabilité.**

Nous avons vu dans un chapitre précédent qu'il était impossible d'utiliser le chloroforme pour la stérilisation des lysats de bactériophage « Cossonay ». Si la centrifugation à vitesse élevée permet en principe d'obtenir un lysat exempt de bactéries, cette méthode n'est pas assez sûre pour l'usage courant. On est donc obligé, si l'on désire débarrasser un lysat des bactéries qu'il contient encore, d'employer la filtration. L'industrie offre sur le marché un grand nombre de filtres stérilisants qui fonctionnent parfaitement, mais il faut remarquer cependant qu'un bon filtre stérilisant n'est pas nécessairement un bon filtre pour les bacté-

riophages. En effet, la filtration d'un lysat bactériophagique doit non seulement permettre de retenir les bactéries et les gros débris bactériens, mais elle doit encore laisser passer le plus grand nombre possible de phages. On sait depuis longtemps que, pour la plupart des filtres, le diamètres des pores joue un rôle assez peu important, beaucoup moins important en tout cas que l'état physique du filtre, la charge électrique des particules, le pH, la viscosité et la tension superficielle du liquide à filtrer.

Les essais que nous avons faits ayant un but essentiellement pratique, nous n'avons utilisé qu'un seul des phages isolés, le Co-g IV. Il s'agissait pour nous de voir dans quelles proportions les filtres utilisés habituellement en bactériologie sont capables de laisser passer les bactériophages.

Nos essais ont porté sur les filtres suivants :

S/GS/1 (Ford) (*)
Seitz EK 5
Chamberland L3
« Membranfilter fein Nr 9 » (Göttingen)

Les trois premiers de ces filtres sont des filtres stérilisants (retenant jusqu'aux plus petites bactéries), tandis que le dernier est un filtre gradué (indications du fabricant : diamètre moyen des pores : 125 mμ ; diamètre maximum : 200 mμ).

Préparation des filtres : les filtres S/GS/1 ont été montés sur des « Hemmings sterimats » ; ces petits appareils sont composés de deux récipients de verre d'une contenance de 10 cc environ ; ces deux récipients sont vissés de part et d'autre d'un anneau métallique dans lequel se trouve une grille, également en métal, sur un des côtés de laquelle est placé le filtre (surface du filtre : environ 1,375 cm^2). L'ensemble est stérilisé pendant 20 minutes à 120°. Le liquide est introduit dans le récipient de verre qui se trouve du côté du filtre, puis le tout est placé, récipient vide en bas, dans une centrifugeuse qu'on fait tourner pendant 30 minutes à 3500 tours/min. La filtration est terminée (5 cc) au bout de ce temps.

Les autres filtres ont été montés sur des récipients de verre munis d'une tubulure latérale permettant le raccordement d'une trompe à eau. Une fois montés, les filtres doivent être stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°.

Préparation du phage : le phage Co-g IV a été préfiltré sur une bougie Chamberland L3 afin d'obtenir une suspension composée exclusivement de bactériophages. Deux dilutions différentes de Co-g IV ont été employées (dilutions faites dans du bouillon) : $1{,}9 \times 10^3$/cc et $1{,}2 \times 10^9$/cc. Pour certains essais, le pH de la suspension a été ajusté au moyen de NaOH à 10 % ou d'acide lactique, de manière à obtenir pH 6, pH 7 ou pH 8.

A. Phage ayant un titre de $1{,}9 \times 10^3$/cc :

1) *Filtres S/GS/1.* (Quantité filtrée : 5 cc)

Six essais ont été faits avec ces filtres, dont 3 avec les filtres secs et 3 avec des filtres mouillés au préalable avec 1 cc de bouillon, qui a été filtré, l'excès étant jeté avant la filtration du phage. Le mouillage est

(*) Les filtres S/GS/1 nous ont été aimablement fournis par Ford ltd, Londres W. C. 1, par l'entremise du Laboratoire de virologie de l'Institut d'Hygiène de Lausanne.

recommandé par certains fabricants ; il a pour but d'éviter une trop grande rétention de liquide par les filtres. Dans les deux cas, les filtrations ont été faites à partir de phage au pH 6, au pH 7 et au pH 8. Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 22.

Filtre	*PH initial*	*pH final*	*titre final*	*perte*
sec	6,0	7,0	—	> 99 %
mouillé	6,0	6,8	—	> 99 %
sec	7,0	7,5	—	> 99 %
mouillé	7,0	7,35	—	> 99 %
sec	8,0	8,2	—	> 99 %
mouillé	8,0	8,0	5/cc	~ 99,7 %

Tableau 22

Filtres S/GS/1 et Co-g IV à 1,9 x 10^3

2) *Filtres Seitz EK 5.*

Les essais ont été faits à partir du phage de pH non ajusté (pH = 6,9). La filtration a été effectuée en 2 temps : 20 cc de phage ont d'abord passé par le filtre, et le filtrat a été prélevé ; ensuite, 50 cc de phage ont été passés par le même filtre, puis ont été prélevés. Cette technique a été employée afin de voir si la rétention de phage se fait de façon régulière ou si elle est différente à la fin de ce qu'elle est au début.

Résultats : le pH, de 6,9 au début, n'a pas varié pendant les deux phases de la filtration. La totalité du phage a été retenue, ou presque, car aucune plage ne s'est formée lors de la titration. La perte est donc supérieure à 99 %.

3) *Filtration sur bougie Chamberland L3.*

Les essais ont été faits en une seule phase, aux pH 6, 7 et 8. Avant l'emploi, chaque bougie a été mouillée avec 10 cc de bouillon, dont l'excès a été jeté. Le tableau 23 donne les résultats qui ont été obtenus.

pH initial	*pH final*	*titre final*	*perte*
6,0	6,6	3,5 x 10^2	81,5 %
7,0	7,5	6,3 x 10^2	67 %
8,0	8,05	5,7 x 10^2	70 %

Tableau 23

Bougie Chamberland L3 et Co-g IV à 1,9 x 10^3

4) *Filtration sur « Membranfilter Nr 9 ».*

Un seul essai a été fait au moyen de ce filtre. Le pH du phage, non ajusté, était de 6,9 au début et n'a pas changé pendant l'opération, qui a été faite avec 50 cc de phage.

Résultats : titre final : $3{,}6 \times 10^2$. Perte : 81 %.

B. Phage ayant un titre de $1{,}2 \times 10^9$.

1) *Filtres S/GS/1.* (Quantité filtrée : 5 cc)

Les essais ont été faits de la même manière qu'avec le phage dilué. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant.

Filtre	*pH initial*	*titre final*	*perte*
sec	6	$2{,}1 \times 10^7$	98,25 %
mouillé	6	$4{,}9 \times 10^4$	$>$ 99,9 %
sec	7	$1{,}1 \times 10^3$	$>$ 99,9 %
mouillé	7	$1{,}3 \times 10^6$	$\sim$ 99,9 %
sec	8	$9{,}0 \times 10^5$	$>$ 99,9 %
mouillé	8	$1{,}5 \times 10^3$	$>$ 99,9 %

Tableau 24

Filtres S/GS/1 et Co-g IV à $1{,}2 \times 10^9$

2) *Filtres Seitz EK 5.*

Comme dans l'essai fait avec le phage dilué, la filtration a été effectuée en deux étapes ; le titre a été mesuré après le passage de 20 cc, puis après le passage de 50 autres cc (pH 6,9).

Résultats : aucune plage ne s'est formée lors de la titration des deux filtrats, ce qui signifie que la perte est pratiquement égale à 100 %.

3) *Filtration sur bougie Chamberland L3.*

Comme dans l'essai fait avec le phage dilué, la filtration a été effectuée en une seule phase, aux pH 6, 7 et 8. Avant l'emploi, chaque bougie a été mouillée avec 10 cc de bouillon, dont l'excès a été jeté. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant.

pH initial	*titre final*	*perte*
6	$2{,}5 \times 10^8$	79 %
7	$2{,}8 \times 10^8$	77 %
8	$1{,}8 \times 10^8$	85 %

Tableau 25

Bougie Chamberland L3 et Co-g IV à $1{,}2 \times 10^9$

4) *Filtration sur « Membranfilter Nr 9 ».*

50 cc de phage Co-g IV, de pH non ajusté (6,9), ont été passés à travers ce filtre. Le titre final étant de $12{,}7 \times 10^9$, la perte est donc nulle.

Discussion.

Les chiffres obtenus dans les essais dont nous venons de donner le détail sont très variés, et permettent de tirer un certain nombre de conclusions. Alors que tous les filtres utilisés ont montré qu'ils ont d'excellentes propriétés stérilisantes au point de vue bactériologique, leur faculté de laisser passer les phages est extrêmement variée, et certains d'entre eux ne conviennent absolument pas. C'est le cas des filtres Seitz et des filtres S/GS/1, ces derniers ayant un comportement assez irrégulier. Avec ces filtres, la rétention de phages est trop importante pour qu'on puisse envisager de les utiliser.

On note par contre de bons résultats avec les bougies Chamberland L3 qui, si elles retiennent une certaine quantité de phages, ne font cependant pas baisser le titre à une valeur trop faible. Pour les « Membranfilter », le résultat le meilleur est obtenu avec le phage à titre élevé ; il est possible qu'une petite quantité de particules soit retenue par le filtre, et que cette quantité soit la même quelle que soit la concentration du phage. Si c'est le cas, les résultats seront donc d'autant moins affectés par ce phénomène que le titre sera plus haut.

Il est donc clair que pour avoir les meilleurs résultats lors d'une filtration, il faut employer des filtres de ce genre (« Membranfilter »). Pour l'usage courant, les bougies Chamberland L3 conviennent parfaitement, et le fait qu'elles peuvent être employées un très grand nombre de fois, au contraire des autres filtres que nous avons essayés, permet des économies appréciables. Les bougies Chamberland offrent encore l'avantage de se colmatter relativement lentement, ce qui est précieux quand les liquides à filtrer sont visqueux ou très riches en bactéries, comme les cultures de terre où l'on recherche du bactériophage.

f) **Vérification de la pureté des deux variétés isolées.**

Nous avons jusqu'à maintenant admis que les deux variétés de phage « Cossonay » sont pures. Les nombreux examens au microscope électronique ont toujours montré une homogénéité parfaite de la variété à grandes plages (têtes allongées) et à petites plages (têtes rondes). Jamais, au cours de ces examens, nous n'avons constaté la présence, même en très faible quantité, d'éléments présentant une morphologie différente de celle des autres éléments.

Mais ces observations ne sont pas suffisantes. Remarquons en passant que le cas du mélange de deux sortes dans le bactériophage « Cossonay » s'est présenté sous une forme très favorable à l'étude, par le fait que les deux variétés de phage possèdent une morphologie différente et des propriétés biologiques différentes. La preuve du mélange et la preuve de la pureté seraient plus difficiles à apporter si les deux variétés possédaient la même morphologie.

Nous avons jusqu'à maintenant deux raisons de considérer les variétés Co-p IV et Co-g IV comme pures, à savoir la morphologie et le fait que les deux sortes descendent d'une plage unique, après de nombreux

passages, Mais nous pouvons imaginer que la séparation a été mal faite, et que l'une des variétés, par exemple Co-p IV, est encore un mélange de deux sortes de phages ayant la même morphologie, mais une ou deux propriétés biologiques différentes.

Cette supposition se base sur une observation. Nous avons dit précédemment que la séparation des deux variétés semblait n'être pas parfaite, à cause des différences de taille des plages qu'on pouvait encore noter après cette séparation. Nous avons parlé de la présence de petites plages dans la variété à grandes plages, et nous avons interprété ce fait par l'existence d'infections tardives. Mais nous avons aussi pu noter la présence de grandes plages dans la variété à petites plages ; pour expliquer ce phénomène, on pourrait supposer l'existence d'infections précoces, ce qui est très peu probable.

Nous avons fait alors une série d'essais pour tenter de trouver une explication valable à ces anomalies.

Dans une première partie, nous avons voulu vérifier que la présence de petites plages dans le phage Co-g IV n'était pas due à une mauvaise séparation. Nous avons procédé de la manière suivante.

Le phage Co-g IV a été ensemencé, à une dilution convenable, sur 3 boîtes de Petri avec la souche 521/57 (technique de Gratia). Après 48 heures à l'étuve, des plages sont apparues, la majorité ayant un grand diamètre, tandis que les autres avaient un diamètre voisin de 0,5 mm. Une petite plage a été repiquée à partir de chacune de ces trois boîtes, les plages ont été dissociées en bouillon, chaque bouillon a été filtré, les filtrats ont été dilués et chacune des dilutions a été titrée en présence de la souche 521/57.

Sur les boîtes où le nombre de plages était suffisant, aucune différence significative n'a pu être notée avec les premières titrations : les grandes plages étaient en majorité, tandis que les petites étaient peu nombreuses. Cette observation permet déjà de conclure que la présence de petites plages dans le phage Co-g IV n'est pas due à un mélange de phages, comme c'était le cas pour le phage « Cossonay » total. Par mesure de précaution, nous avons répété toute la série des opérations, mais en partant de petites plages prélevées sur les boîtes provenant de la première séparation. Les nouveaux résultats ont confirmé les premiers. En effet, la proportion des grandes et des petites plages est restée la même qu'au début. Il semble donc bien que la présence de petites plages dans le phage Co-g IV n'est pas due à un mélange, mais bien à l'existence d'infections tardives.

La deuxième partie des essais a été consacrée à l'étude des grandes plages trouvées dans le phage Co-p IV. Ces grandes plages, rappelons-le, ne sont visibles que si l'on titre une dilution assez faible, car elles n'existent qu'en très petite proportion. Il faut encore remarquer un fait important, sur lequel nous reviendrons plus loin. Si des grandes plages se forment quand une dilution faible de Co-p IV est titrée, il n'en est pas de même si c'est une dilution d'une seule plage de Co-p IV qui est titrée. Il arrive parfois qu'on note la présence de grandes plages dans les titrations de ces dilutions, mais c'est très rare, et ces plages sont beaucoup moins nombreuses que lorsque c'est le phage lui-même qui est titré.

Nous avons fait de nouvelles séparations pour essayer d'élucider cette question des grandes plages. Les expériences ont été faites exactement comme pour le phage Co-g IV, mais avec quelques précautions supplémentaires. En effet, dans le cas du phage Co-p IV, les grandes plages ne sont visibles, à cause de leur petite quantité, que dans des dilutions peu poussées ; mais dans ce cas les petites plages sont très nombreuses, et il est difficile de repiquer une grande plage sans toucher en même temps une ou plusieurs petites. Nous avons dû faire un grand nombre d'essais avant d'obtenir une plaque où une grande plage était nettement isolée. Cette plage a été prélevée, dissociée en bouillon, le bouillon a été filtré et le filtrat dilué. Ces dilutions ont été titrées selon la méthode habituelle.

La séparation a partiellement réussi. En effet, nous avons obtenu, sur les plaques servant aux titrations, une importante proportion de grandes plages. Mais la présence de petites plages encore assez nombreuses nous a fait penser que nous avions repiqué involontairement, lors de la séparation, une petite plage en même temps qu'une grande. Une des grandes plages a alors été prélevée, et la même série d'opérations a été faite. La titration a montré une très grande proportion de grandes plages. Une nouvelle séparation a été effectuée. La titration a montré que cette fois les grandes plages étaient en forte majorité. Il a été impossible, même en faisant une nouvelle séparation, d'obtenir un phage ne donnant que des grandes plages. Nous avons préparé, à partir du dernier filtrat, un stock de phage appelé *Co-p IV (G)*.

A partir de ce même dernier filtrat, nous avons préparé, par culture aérée en présence de la souche 521/57, un stock de phage appelé *Co-p IV (G) a ;* enfin, un phage appelé *Co-p IV (G) b* a été obtenu par filtration de Co-p IV (G) a, qui s'était infecté après un séjour à la glacière.

Nous avons donc pu séparer le phage Co-p IV en deux variétés, dont l'une donne des petites plages mélangées de grandes en faible proportion, exactement comme le phage Co-p IV (nous avons déjà dit qu'il était impossible de se débarrasser complètement de ces grandes plages), tandis que l'autre donne des plages nettement plus grandes (le plus souvent 1 mm et davantage), mais qui sont cependant différentes des grandes plages données par le phage Co-g IV.

Nous avons fait une série d'essais pour étudier quelques propriétés de la deuxième de ces variétés.

1) *Morphologie.* On pourrait supposer que la séparation du phage « Cossonay » total a mal réussi, puisque le phage à petites plages donne encore un certain nombre de grandes plages, et qu'il est possible d'isoler une variété à grandes plages à partir de Co-p IV. Il s'agit donc de déterminer si le nouveau phage qui a été isolé est analogue à Co-g IV ou s'il en est différent.

L'examen au microscope électronique permet de donner une réponse sans équivoque à cette question. En effet, la morphologie du phage Co-p IV (G) est en tous points semblable à celle de Co-p IV (tête ronde). L'observation de nombreuses préparations a confirmé ce que nous avions

vu dès le début. Il semble donc que le phage Co-p IV (G) est une variété à grandes plages du phage Co-p IV ; nous pouvons donc affirmer que la séparation initiale du phage « Cossonay » total a été faite correctement. Mais l'observation de la morphologie de Co-p IV (G) ne suffit pas. Il faut encore voir si ce phage ne se distingue de Co-p IV que par la dimension de ses plages, ou s'il existe des différences de propriétés biologiques, qui seraient visibles par exemple dans le spectre d'action.

2) *Propriétés biologiques.* Nous avons fait une série d'essais pour étudier les propriétés biologiques de la nouvelle variété isolée. Nous n'avons constaté aucune différence dans le spectre d'action ; Co-p IV et Co-p IV (G) attaquent en effet les mêmes souches. Co-p IV (G) peut lyser en particulier les souches 801, 806 et 810 qui, on le sait, sont sensibles à Co-p IV, mais que ni Co-g IV, ni « Phagus polonus » ne peuvent attaquer.

L'intérêt pratique de cette nouvelle variété est très limité. En ce qui concerne la lysotypie, il est même nul, puisque le spectre d'action est le même que celui de Co-p IV.

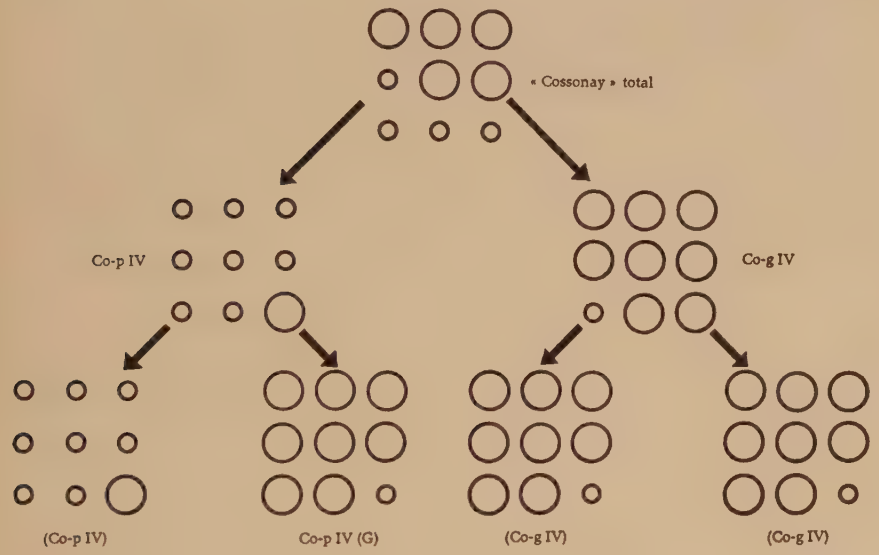
3) *Sérologie.* La sérologie sera étudiée dans un chapitre ultérieur, mais nous pouvons déjà dire qu'il ne semble exister aucune différence de propriétés antigéniques entre les phages Co-p IV et Co-p IV (G).

Il reste à tenter d'expliquer l'origine de cette variété à grandes plages. Nous pouvons formuler une hypothèse, qui est basée sur une observation que nous avons déjà signalée. Les grandes plages du phage Co-p IV se forment en plus grand nombre quand on titre le phage lui-même que si la titration est faite avec le filtrat d'une petite plage. Quand une bactérie est infectée par un phage à tête ronde, le processus de la lyse se fait bien entendu de la façon habituelle ; de nombreux phages sont libérés après l'éclatement de la bactérie. La plupart du temps, tous les phages obtenus sont tels que, s'ils infectent une nouvelle bactérie, ils donneront naissance à une petite plage. Mais il peut arriver, et c'est là notre hypothèse, que parmi les phages libérés, l'un d'entre eux possède la faculté de donner naissance à une grande plage. Si cette variation est phénotypique, elle n'est par conséquent pas héréditaire, et les phages trouvés dans la grande plage ne donneront par la suite que des petites plages. Si, au contraire, la variation est génotypique, elle est héréditaire, et les phages de la grande plage, ainsi que leurs descendants, formeront des grandes plages.

L'observation nous a montré que la variation est héréditaire ; il s'agit donc d'une mutation. Il nous reste à expliquer pourquoi les phages à grandes plages sont plus nombreux dans le phage Co-p IV que dans le filtrat d'une petite plage. L'explication est simple ; elle est du reste semblable à celle que nous avons donnée à propos de la variation de la proportion des grandes et des petites plages dans le phage « Cossonay » total. Les phages présents dans une petite plage doivent normalement donner naissance à des petites plages. Mais admettons qu'il se trouve, à la suite d'une mutation, de rares éléments capables de former des grandes plages. Supposons par exemple que ces éléments existent dans une proportion de

1/20'000. Nous allons maintenant repiquer cette plage en bouillon, filtrer le bouillon, et préparer un stock de phage au moyen de ce filtrat. Les phages vont infecter les bactéries sensibles, et le processus de la lyse va se poursuivre. Mais les bactéries infectées par des phages à grandes plages se lyseront plus vite que les autres (on sait que c'est en particulier à la vitesse de la lyse qu'est due la grandeur d'une plage). Les phages à grandes plages seront donc libérés dans le bouillon avant les autres ; ils infecteront de nouvelles bactéries, et là encore, la vitesse de la lyse sera grande. A la fin de l'opération, la proportion des phages à grandes plages sera plus élevée qu'elle ne l'était dans le filtrat initial.

Il nous paraît intéressant de résumer par un schéma les diverses séparations qui ont été faites avec le phage « Cossonay », schéma indiquant les tailles des plages présentes dans chaque sorte.



(Fig. 2)

Séparations faites avec le phage « Cossonay ».

Si nous voulons résumer les différents types de plages qu'on peut obtenir avec les diverses préparations de phage « Cossonay » et la souche 521/57, nous trouvons :

1) 2 types de grandes plages, les unes formées par le phage Co-g IV, les autres par le phage Co-p IV , où elles se trouvent en faible proportion, et par le phage Co-p IV (G), où elles se trouvent en majorité.

2) 3 types de petites plages : les unes forment la majorité du phage Co-p IV : d'autres sont formées par le phage Co-g IV, mais elles ont pour origine un phage à grandes plages ayant infecté tardivement une bactérie ; on trouve enfin des petites plages dans le phage Co-p IV (G) ; elles se forment dans les mêmes conditions que les précédentes (infection tardive). Ces trois types sont nettement distincts. Le premier type comprend des plages formées par le phage à tête ronde ; si on repique une telle plage, on obtiendra à nouveau des petites plages en forte majorité. Le deuxième type comprend des plages formées par le phage à tête allongée ; si on repique une de ces plages, on obtient une majorité de grandes plages. Le troisième type comprend des plages formées par le phage à tête ronde ; si on repique une de ces plages, on obtient également une majorité de grandes plages.

Il est évident que toutes ces sortes de plages pourraient être trouvées sur une plaque ensemencée avec la souche 521/57 et le phage « Cossonay » total.

La typisation appliquée aux mycobactéries

Nous avons dit, au début de ce travail, l'intérêt immense de la technique de la typisation par les bactériophages ; nous avons aussi indiqué le très large emploi qui en est fait dans le groupe des Salmonelles. Avant de parler de l'application qui peut en être faite aux mycobactéries, il est nécessaire de donner quelques détails sur les principes de cette technique et sur les résultats qu'elle donne.

La lysotypie est due à une idée de Sonnenschein [**11**], mais elle a subi de nombreux perfectionnements, dus en particulier à Craigie et Yen [**88**] [**89**].

Lysotypie par les phages non adaptés.

C'est le procédé le plus simple, mais dont les résultats ne sont pas toujours faciles à interpréter. Presque chaque laboratoire utilise une technique qui lui est propre ; ces techniques ne diffèrent entre elles que par certains détails peu importants, et le principe reste le même.

On ensemence la ou les souches qu'on désire étudier sur une boîte de Petri contenant de la gélose, puis on dépose une goutte de chacun des bactériophages à disposition à la surface de ce même milieu de culture. Les phages employés doivent être absolument purs pour donner des résultats valables (la purification se fait généralement par la méthode que nous avons déjà indiquée, c'est-à-dire par des isolements successifs de plages). Les phages doivent autant que possible être différents les uns des autres et provenir de pays différents (la distribution géographique de certains types de phages est très limitée). Les cultures sont alors incubées à l'étuve pendant le temps nécessaire au développement des bactéries, et la lecture peut être faite. Les résultats sont notés comme nous l'avons indiqué à la page 74. On peut même se contenter, dans certains cas, de désigner les réactions où la lyse se produit par le signe +, et celles où la lyse ne se produit pas par le signe –.

Plusieurs cas peuvent se présenter. Dans les cas les plus favorables, chaque souche bactérienne n'est lysée que par un seul des phages utilisés pour la typisation, et la détermination du type bactérien est grandement facilitée. Il faut bien le dire, ces cas sont assez rares ; on en connaît cependant quelques exemples ; chez les mycobactéries, dont nous parlerons plus loin, ils sont encore inconnus.

Il arrive souvent que seul un des phages soit spécifique, alors que les autres lysent plusieurs types de bactéries ; ces phages sont alors appelés « phages homologues ».

Enfin, et c'est le cas le plus fréquent, aucun des phages utilisés n'est spécifique vis-à-vis d'un type déterminé de bactéries. Il faut alors tenir compte de l'action de tous les phages pour la détermination du type d'une bactérie. Rappelons qu'on classe dans le même « type » toutes les bactéries présentant ce qu'on appelle la même « image de réaction », c'est-à-dire les bactéries qui sont sensibles aux mêmes phages et résistantes aux mêmes phages.

Lysotypie par les phages adaptés.

Cette lysotypie présente un grand avantage par rapport au système précédent, parce qu'elle est beaucoup plus spécifique, et que les résultats

en sont plus faciles à interpréter. Elle est basée sur un principe connu depuis longtemps, pratiquement depuis la découverte du bactériophage.

On sait en effet que les bactériophages peuvent facilement acquérir une virulence élevée pour une souche qui n'était, au début, que médiocrement sensible. On dit qu'ils ont une grande faculté d'adaptation.

Cette adaptation se remarque particulièrement bien lors de l'isolement d'un nouveau phage. Lorsqu'on fait le premier passage, la lyse est généralement très faible, et la culture contenant le phage ne montre que peu de différence avec le témoin. Mais si on fait de nouveaux passages, la lyse devient plus accentuée, à condition qu'on emploie toujours la même souche bactérienne pour les passages successifs. Il ne s'agit pas seulement d'une augmentation du titre du phage (elle a lieu cependant), mais surtout d'une véritable adaptation du phage à la souche qui a servi à le régénérer. Il y a donc une augmentation de l'efficacité d'étalement.

Un exemple fera mieux comprendre ces phénomènes. Supposons que nous possédons un bactériophage ayant une activité lytique identique sur deux souches A et B, cette activité étant relativement faible. Si l'on régénère maintenant le phage sur la souche A, on verra que son activité lytique augmentera fortement pour la souche A ; par contre, son activité vis-à-vis de la souche B restera inchangée ; il se peut même qu'elle diminue.

Diverses explications, dans le détail desquelles nous ne voulons pas entrer, ont permis de mieux comprendre le phénomène de l'adaptation. On a pu prouver que cette adaptation peut être phénotypique, c'est-à-dire non héréditaire et intéressant l'ensemble de la population des phages. Dans ce cas, l'adaptation est très souple, et peut être réversible : si on reprend le phage adapté à la souche A et qu'on le régénère sur la souche qui avait servi à le préparer avant son adaptation, on obtiendra de nouveau un phage absolument identique au premier, c'est-à-dire que son activité sera la même pour la souche A et pour la souche B. Cette adaptation phénotypique existe en particulier chez un grand nombre de phages de *Salmonella typhi*.

Mais la variation peut être génotypique, donc héréditaire. Cette sorte de variation est plus rare que la première, mais on en connaît cependant plusieurs cas, en particulier chez le phage A (il s'agit d'un bactériophage qui est à l'origine de la plupart des préparations utilisées dans le système de lysotypie préconisé par Craigie et Felix).

Une variation héréditaire est une mutation. Alors qu'à notre connaissance personne n'a pu prouver que les agents mutagènes utilisés habituellement en biologie ont une action sur les bactériophages en milieu extérieur, c'est-à-dire hors des bactéries, de nombreux auteurs ont étudié les mutations produites par ces agents chez les bactéries infectées par des bactériophages. La première étude approfondie de ce phénomène semble avoir été faite par Latarjet en 1949 [**90**]. Cet auteur a pu en effet démontrer l'action mutagène des rayons ultra-violets sur les bactéries infectées. Plus tard, ce même auteur montrait que la fréquence des mutations chez les cultures irradiées était 37 fois supérieure à celle qu'on pouvait noter

chez les mêmes cultures, mais non irradiées [**91**]. La fréquence des mutations varie évidemment suivant les souches et suivant les phages ; cette fréquence s'estime par rapport à une particule de phage et à une génération. Pour le phage T2 (coliphage) et son mutant T2*h*, la fréquence atteint 15×10^{-6} chez les cultures non irradiées.

Les variations génotypiques constatées lors de l'adaptation d'un phage à une nouvelle souche s'expliquent donc par une sélection de mutants préexistant dans la suspension de phage utilisée pour l'adaptation ; ces mutants ont été libérés au moment de la préparation du phage. La sélection élimine la plus grande partie des particules non spécifiques. Ces mutants étant stables, l'adaptation n'est pas réversible, et de nouveaux passages sur la première souche ne modifient plus la spécificité du phage.

Certains bactériophages possèdent la faculté d'adaptation à un degré très élevé (adaptation génotypique ou phénotypique), tandis que d'autres ne l'ont qu'à un degré plus faible.

L'utilisation des phages possédant une faculté d'adaptation élevée est des plus intéressantes pour la lysotypie. On fait appel dans ce cas à ce qu'on nomme la « dilution critique » (ou « dilution limite »). Il s'agit de la plus grande dilution donnant encore une lyse confluente. Il est évident que cette dilution limite ne donne qu'une idée assez approximative du nombre de phages présents dans cette dilution ; en effet, suivant que le phage donne des petites ou des grandes plages, il faudra une concentration plus ou moins élevée en phages pour donner la lyse confluente. Mais cette approximation suffit largement dans la plupart des cas, et en particulier pour la lysotypie. A la dilution critique, un phage adapté possède une activité élevée vis-à-vis de la souche sur laquelle il a été régénéré, ainsi que vis-à-vis des souches analogues, tandis qu'il n'est que très peu ou même pas actif sur les autres souches.

On voit que l'utilisation de phages adaptés permet un meilleur système de lysotypie, étant donné que les phages en question sont beaucoup plus spécifiques.

A l'heure actuelle, une des plus belles applications de la lysotypie par les phages adaptés est celle qui concerne *Salmonella typhi* [**85**] ; ce système a été rendu possible grâce aux travaux de Craigie et Yen [**88**] ; la méthode a du reste été perfectionnée par la suite grâce à l'utilisation de nouveaux types de phages. Mais la lysotypie est également utilisée pour d'autres bactéries, en particulier *Salmonella paratyphi B* [**92**], *Salmonella typhimurium* [**93**] ; de très nombreux systèmes ont été proposés pour la lysotypie des staphylocoques ; les premiers auteurs ayant utilisé la méthode de la dilution critique sont Wilson et Atkinson [**94**]. On connaît encore la lysotypie des corynébactéries [**95**], et celle des *Escherichia coli* pathogènes pour les nourrissons, due à Nicolle et coll. [**96**]. Par ailleurs il est des plus probables que le principe de la lysotypie peut être appliqué à toutes les bactéries pour lesquelles on possède un bactériophage (ou mieux, plusieurs bactériophages) actif.

Cas des mycobactéries.

La découverte de bactériophages actifs sur les mycobactéries non pathogènes d'abord, puis sur les mycobactéries pathogènes a, dès le début, laissé entrevoir la possibilité d'une typisation de ces germes par les phages. Nous avons signalé tout au début de ce travail l'intérêt que présenterait une telle classification.

Il est difficile de dire à quel auteur est dû le premier système de typisation des mycobactéries. En fait, la première communication sur l'isolement d'un mycobactériophage contenait déjà l'amorce, si petite fût elle, d'une typisation. En effet, GARDNER et WEISER [**18**], ayant isolé un bactériophage actif sur *Mycob. smegmatis,* ont essayé l'activité de ce phage sur d'autres souches. Ils se sont aperçu qu'il lysait la souche employée pour l'enrichissement, mais qu'il était incapable de lyser une autre souche de *Mycob. smegmatis,* ainsi qu'une souche de *Mycob. phlei.* Ce début, bien modeste à la vérité, est en fait le commencement de la typisation. En effet, la simple étude du spectre d'action d'un bactériophage donne de précieux renseignements. Cela permet déjà la séparation des souches étudiées en souches sensibles et souches résistantes. Chaque auteur ayant isolé un bactériophage ne manque pas d'en étudier l'action sur un certain nombre de souches. Mais ce n'est pas suffisant. Il serait intéressant de posséder un mycobactériophage vraiment spécifique. Si l'on examine les publications se rapportant aux mycophages isolés ces dernières années, on s'aperçoit que, le plus souvent, les phages, loin d'être spécifiques, s'attaquent au contraire à un grand nombre de souches, parfois très différentes les unes des autres. Les premières souches de bactériophages actifs sur les mycobactéries pathogènes ne lysaient que les bacilles humains et bovins, à l'exclusion des autres (aviaires, murins), mais lysaient cependant certaines mycobactéries saprophytes. Par la suite, des souches lysant tous les types de mycobactéries ont été isolées ; elles présentent certes un grand intérêt, mais ne peuvent pas rendre de grands services dans un système de lysotypie.

Nous allons maintenant examiner les différentes tentatives qui ont été faites jusqu'à maintenant pour établir un système efficace de typisation des mycobactéries.

En 1949 déjà, PENSO et ORTALI [**12**] ont compris l'intérêt que peuvent présenter les mycophages pour la définition des types de beaucoup de mycobactéries. Ces auteurs ont employé 5 phages différents, déjà étudiés par eux-mêmes au cours d'essais antérieurs, à savoir *Phagus phlei, Phagus lacticola, Phagus Rabinowitchi, Phagus smegmatis* et *Phagus Pellegrini.* Nous reviendrons dans un chapitre ultérieur sur la nomenclature de ces phages ; disons simplement que les noms proposés par Penso et Ortali sont basés sur la morphologie et l'activité du phage, ainsi que sur les réactions sérologiques.

En utilisant chacun de ces phages à sa dilution critique, il aurait été possible d'obtenir des résultats intéressants ; les auteurs se sont bornés à utiliser, pour chaque phage, une suspension contenant un million de particules par cc. Les « images » obtenues permettent cependant un cer-

tain nombre de conclusions utiles. Le *Phagus Pellegrini* est de loin le plus spécifique, puisque, sur 107 mycobactéries étudiées, 3 seulement se montrent sensibles à son action, la plus sensible des trois étant la souche Pellegrino. Ensuite vient le *Phagus phlei,* avec 9 souches sensibles. Les autres phages attaquent un grand nombre de souches, souvent les mêmes, et l'image obtenue va des plages isolées à la lyse totale. Les auteurs ne cherchent du reste pas à utiliser ces résultats pour le diagnostic du type d'une mycobactérie, mais ils signalent la possibilité de le faire. Les deux phages les plus intéressants sont certainement *Phagus phlei* et *Phagus Pellegrini ;* en effet, les souches sensibles à l'un ou l'autre de ces deux phages ne sont pas attaquées par les trois autres phages étudiés. L'utilisation de ces cinq phages à leur dilution critique aurait sans doute donné des résultats plus précis.

En employant des phages concentrés, Hnakto [**23**] obtient également des résultats intéressants qui, s'ils ne sont pas directement utilisables en vue d'une typisation, permettent cependant un certain nombre de conclusions. Quelques-uns des 22 phages utilisés (la plupart isolés par l'auteur) se montrent particulièrement spécifiques, car ils n'attaquent qu'un nombre restreint de souches de mycobactéries.

Une tentative de typisation est faite un peu plus tard par le même auteur [**34**]. Mais, dans ce cas encore, Hnakto a recours à des phages non dilués, ce qui diminue considérablement la précision des résultats. Cependant, avec les 11 bactériophages utilisés, l'auteur réussit une classification des mycobactéries étudiées en 9 groupes différents, selon leur sensibilité aux phages. Il reconnaît lui-même que ces premiers essais ont une portée encore limitée.

Il est évident que le problème est extrêmement compliqué. Compliqué parce que les mycobactéries constituent un groupe immense dont l'importance ne cesse de croître, compliqué à cause d'un manque de standardisation des méthodes, et compliqué parce que chaque chercheur tente de proposer son propre système.

Il faut bien se rendre compte que la mise au point d'une typisation des mycobactéries est une entreprise de très longue haleine, qui ne peut être menée que par une équipe de chercheurs disposant de moyens considérables. Aussi, il n'est pas question que nous établissions un système de typisation avec les quelques phages que nous avons à notre disposition.

Nous avons déjà signalé les recherches entreprises par Froman [**13**], et dont les résultats finaux ne sont pas encore connus. Froman a bien voulu nous confier une classification provisoire, qui ne porte encore que sur les mycobactéries saprophytes, bien que certains des phages employés soient capables de lyser des bacilles virulents.

Nous allons examiner maintenant le spectre d'action des deux variétés de phage « Cossonay » (et, à titre de comparaison, celui de « Phagus polonus ») afin de voir si ces phages sont différents de ceux qui ont été utilisés par Froman dans ses essais. Cette confrontation ne peut être que limitée, car les mycobactéries employées par Froman sont différentes, pour une grande partie, de celles que nous avons étudiées.

Du reste, l'examen d'un petit nombre de souches nous permettra de tirer une certaine quantité de conclusions. Les souches suivantes ont été utilisées par Froman et correspondent à celles que nous avons étudiées : 17, 521 ; 799 ; 61, 171 ; 15, 60, 76 et 152 ; 52, 62, 172 (cette souche a été employée par Froman sous deux formes : l'une reçue de Lausanne et provenant du C. I. C. C. et l'autre reçue d'un autre laboratoire ; les deux souches sont des repiquages différents de la souche ATCC 359 = NCTC 334), 133 et 908 ; 68 et 907 ; 75 ; 522 ; 153 et 906. Nous avons intentionnellement groupé ces mycobactéries comme Froman les a groupées d'après leur sensibilité aux phages qu'il a employés, chaque groupe comprenant des mycobactéries sensibles aux mêmes phages et résistantes aux mêmes phages.

Les souches 17, 521 et 799 appartiennent, avec d'autres, au groupe I de Froman, groupe formé des souches les plus sensibles, puisque 11 des 12 phages utilisés sont capables de les lyser. Nous constatons que ces trois souches présentent une égale sensibilité aux phages « Cossonay » et à « Ph. polonus ».

Les souches 61 et 171, sensibles à 8 des 12 phages de Froman, sont résistantes aux deux phages « Cossonay », ce qui signifie que ces deux phages, s'ils sont analogues à l'un ou l'autre des phages employés par Froman, ne peuvent plus être que l'un des quatre restants.

Les souches 15, 60, 76 et 152 sont rangées par Froman dans le groupe III, parce qu'elles se comportent de la même façon vis-à-vis des phages étudiés. Il devient évident que les phages « Cossonay » sont différents des 12 phages de Froman, quand on sait que la souche 15 est résistante à Co-p IV et à Co-g IV, tandis que les trois autres souches sont sensibles.

Les souches 52, 62, 172, 133 et 908 sont rangées dans un même groupe par Froman, parce qu'elles sont sensibles à 8 des 12 phages employés. Mais leur comportement n'est pas le même vis-à-vis des phages « Cossonay » ; ceci est une preuve de plus que les phages que nous avons isolés sont différents de ceux de Froman.

En comparant les résultats obtenus par cet auteur avec ceux que nous avons obtenus, il est facile de se rendre compte que d'une part les phages « Cossonay » ne feraient pas double emploi avec les 12 phages employés par Froman dans ses premiers essais de typisation, et que d'autre part l'introduction (sous une forme que nous allons discuter) des phages « Cossonay » dans ce système de typisation aurait pour effet de séparer en sous-groupes certains des groupes existants ; la classification obtenue serait ainsi plus compliquée, mais aussi plus précise.

Possibilité de l'emploi des phages « Cossonay » et du « Phagus polonus » dans un système de typisation.

Nous avons déjà dit que l'établissement d'un système valable de typisation des mycobactéries devait être fait au moyen d'un grand nombre de phages. Il ne saurait donc être question d'employer seulement dans ce but les 2 phages « Cossonay » et le « Phagus polonus ». En effet, si ces trois phages donnent déjà des résultats intéressants et permettent une

classification sommaire des bactéries étudiées, il reste un grand nombre de mycobactéries qui ne sont pas attaquées par ces phages, mais qui sont peut-être sensibles à un ou plusieurs autres.

Nous allons cependant tenter de classer les mycobactéries que nous avons étudiées en un certain nombre de groupes, comprenant chacun des souches réagissant de la même façon aux trois phages.

Il convient de faire encore une remarque. Nous avons signalé, à propos des premiers essais de typisation, que l'emploi de stocks concentrés donne des résultats trop peu précis, puisque ces phages à titre élevé donnent une lyse totale aussi bien avec les souches très sensibles qu'avec les souches peu sensibles. A l'opposé se trouve la méthode que nous avons employée, qui est de loin la plus précise, puisqu'elle mesure exactement l'efficacité d'étalement. Entre les deux extrêmes se trouve la méthode de la dilution critique, qui donne des résultats généralement suffisants pour la lysotypie. Les chiffres que nous avons donnés à la page 85 sont donc, si l'on peut dire, trop précis. Sans refaire les expériences, ce qui serait inutile, nous allons donner les résultats tels qu'ils seraient apparus avec la méthode de la dilution critique.

Test de dilution critique : il s'agit, rappelons-le, d'utiliser un bactériophage donné à la plus forte dilution qui donne encore une lyse totale sur la souche qui a servi à la préparation du phage (on emploie une goutte de bactériophage déposée à la surface d'une plaque de gélose ensemencée avec la souche sensible). Il est difficile de dire quel doit être le titre d'une telle dilution. Le diamètre des plages joue en effet un rôle important ; il faudra par exemple utiliser une concentration plus élevée pour obtenir une lyse totale avec un phage donnant de très petites plages que pour en avoir une avec un phage à grandes plages. Il importe aussi d'ensemencer toujours une quantité identique de phage, afin que la zone touchée par la suspension soit toujours la même. Enfin, il ne faut pas se tenir trop près de la limite de la dilution, car une telle préparation pourrait donner une fois des plages confluentes et une autre fois une lyse totale.

Nous avons donc dû choisir la dilution pour chacun des phages ; comme l'un d'entre eux (Co-p IV) donne des plages particulièrement petites, la concentration nécessaire est plus élevée. Voici sur quelles bases nous avons fait nos calculs pour les phages 1, 2, 3, 4, 7, 8 et 9, il faut 2×10^4 phages/cc pour obtenir à coup sûr la lyse totale (la marge de sécurité est comptée très largement). Pour le phage 5, il en faut 2×10^6/cc. Les logarithmes de ces deux nombres sont respectivement 4,30 et 6,30. Comme on n'utilise qu'une goutte de suspension, le nombre des phages utilisés est 20 fois moins grand (1 goutte = env. 1/20 cc) ; 10^3 et 10^5, dont les logarithmes sont 3,00 et 5,00.

Le nombre des plages formées dans chaque cas se calcule facilement à partir des chiffres donnés dans le tableau de la page 85. Les abréviations utilisées sont analogues à celles qui ont été indiquées à la page 73.

Les résultats sont donnés dans le tableau 26 (p. 114).

Souche	*Phages*							
N°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*7*	*8*	*9*
17	LCV	LCV	LCV	LCV	LCV	LCV	LCV	+++
55/b	+	LCV	LCV	+	LcV	LCV	LCV	LCV
59	+	++	+++	++	–	++	LCV	++
60	+	LCV	LC	+	–	LcV	LC	++
68	+	LC	LC	+	+++	LC	LC	+++
76	–	LCV	LCV	+	–	+++	LC	++
77	–	Lc	LC	–	–	LC	LC	++
78	–	LcV	LCVV	+	LcV	Lc	LC	LC
89	–	–	–	–	–	–	–	–
133	+++	LCV	LCV	++	LC	LcV	LcV	LcV
152	+	LCV	LCV	–	++	LC	LC	++
172	::::	–	–	–	–	–	::::	–
176	::::	–	–	–	–	+	::::	::::
182	–	+	+	++	–	+	++	–
214	++	LC	LC	++	LC	LC	LC	++
521/57	LC	LC	LC	+++	LC	LC	LC	+++
690	+	LC	LC	–	–	LC	LC	LCV
714	+	Lc	LC	+	+	LC	LC	LC
725	+	LC	LC	+	+++	Lc	LC	LC
726	+	LC	LC	+	–	LC	LC	++
798	LcVV	LCV	LCV	LcV	LCV	LCV	LCV	++
799	+++	LC	LC	++	LC	LC	LC	++
801	–	–	–	–	+	–	–	–
804	+	+++	+++	Lc	LC	+++	+++	++
806	–	–	–	–	–	–	–	–
810	–	–	–	–	++	–	–	–
900	–	+	+	+	+	+	+	–
904	::::	+	+	+	–	::::	+	–
907	–	++	+	++	–	::::	+	–
908	+	+	++	+	+	+	+	–
909	+	LC	LC	+	–	Lc	LC	++
1114	LC	LC	LC	+++	LC	LC	LC	+++

Tableau 26 (test de dilution critique)

Discussion :

Les résultats que nous donnons ne peuvent évidemment pas tous servir à une typisation. En effet, comme nous l'avons déjà dit, une typisation ne peut être faite qu'au moyen de phages purs. La gamme de phages que nous avons employée est formée de 3 mélanges de phages (1, 2 et 3) et de 5 phages purs (4, 5, 7, 8 et 9). Rappelons encore que 2 d'entre eux (4 et 5) ont été préparés avec la souche 521/57, tandis que les autres ont été préparés avec la souche 909. Si nous laissons maintenant de côté les

résultats obtenus avec des mélanges de phages, nous allons pouvoir classer nos mycobactéries en un certain nombre de groupes, chaque groupe comprenant les souches réagissant d'une façon identique ou comparable.

Groupe I : 214, 521/57, 798, 799, 1114
Groupe II : 59, 60, 76, 726, 909
Groupe III : 900, 908
Groupe IV : 801, 810
Groupe V : 78, 133, 725

Les autres souches ne peuvent pas être classées, soit parce qu'elles résistent à tous les phages, soit parce qu'il manque certains résultats, soit enfin parce qu'elles présentent des images de réactions isolées.

Comme nous avons eu l'occasion de le dire plusieurs fois, l'établissement d'un système de lysotypie ne peut se faire qu'avec un nombre considérable de souches bactériennes et une grande quantité de phages différents. Si l'on compare le tableau 26 au tableau 16, on s'aperçoit que des souches donnant par titration des résultats passablement différents, donnent, par la méthode de la dilution critique, des résultats semblables, qui permettent de classer dans le même groupe des bactéries qui ne réagissent pas de la même manière aux phages. La classification que nous avons donnée est donc, pour les deux raisons que nous venons d'indiquer, un simple exemple de ce qu'il est possible de faire, et n'a aucune autre prétention.

La meilleure solution, à notre avis, pour l'établissement d'un système de lysotypie, est l'emploi de phages adaptés, qui donnent des résultats valables et précis dans le cas des bacilles typhiques. L'application pure et simple de cette méthode aux mycobactéries est impossible. Il convient tout d'abord de mesurer le pouvoir d'adaptation des phages que l'on possède. Certains des résultats que nous avons obtenus sont intéressants à ce point de vue.

Il est nécessaire de résumer très brièvement l'histoire de l'isolement et de la propagation du phage « Cossonay », puis de ses deux filières.

Le phage « Cossonay » a été isolé d'une larve de moustique et, dans ce milieu, il s'est évidemment développé aux dépens de mycobactéries que nous n'avons malheureusement pas pu isoler. Au cours de l'isolement et des premiers essais d'exaltation de la virulence du phage, nous avons employé exclusivement la souche 909. Il y a eu 8 passages successifs sur cette souche. Toutes les conditions étaient donc réalisées pour que le phage, en supposant qu'il soit adaptable, s'adapte à cette souche 909. Le schéma de la page 116 donne le résumé de ce qui a été fait. Nous n'avons pas encore parlé du phage Co-1957, parce que notre stock de ce phage s'est épuisé. C'est à partir de lui que nous avons fait les préparations des autres variétés de phage « Cossonay », et en particulier les séparations.

Les filières Co-p IV et Co-g IV proviennent donc de Co-1957, mais elles ont été propagées dès leur isolement sur la souche 521/57.

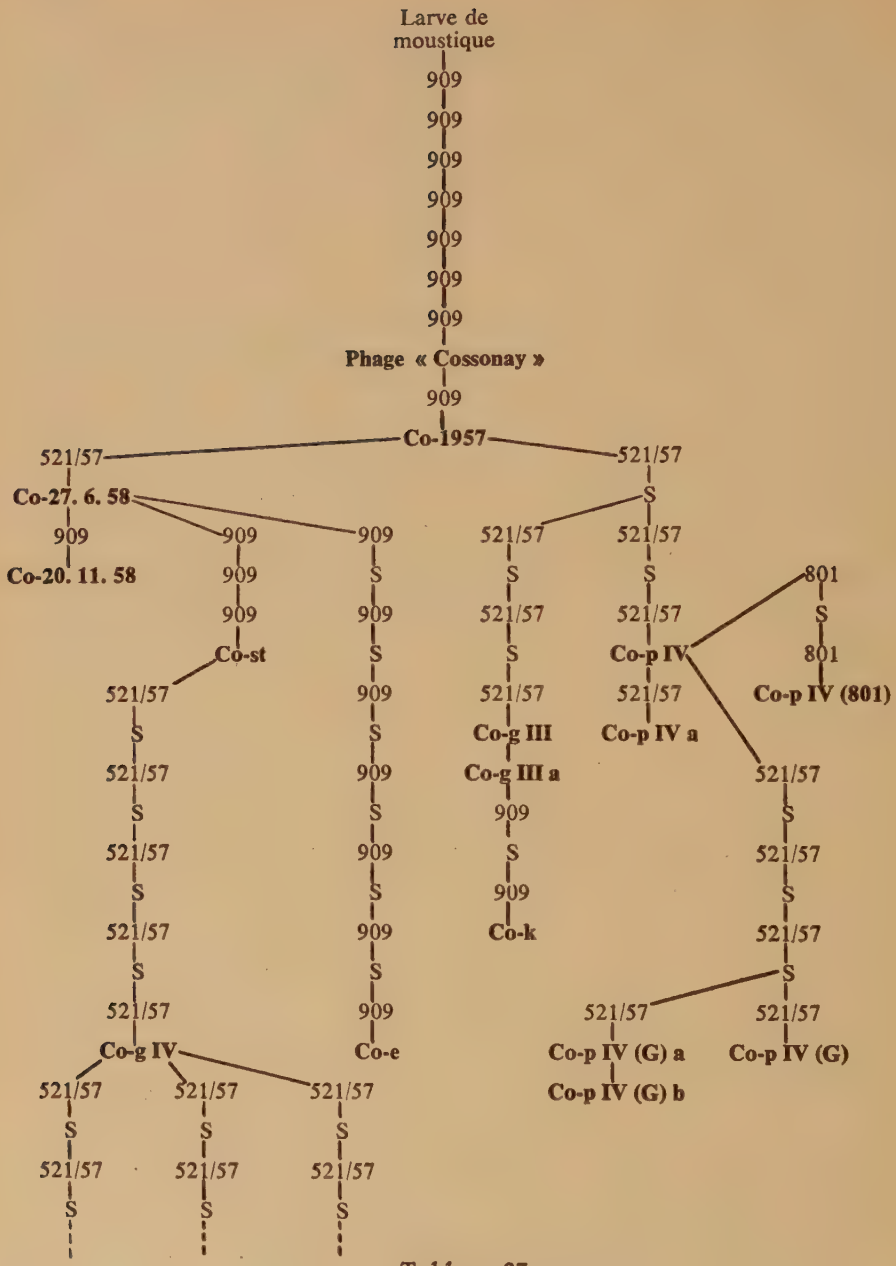


Tableau 27
Préparation des phages « Cossonay »
(S = séparation)

L'examen du tableau de la page 116 nous permet de voir en particulier que toutes les sortes ont, à un moment donné, passé par la souche 909 et par la souche 521/57. Les résultats que nous avons donné dans le tableau 16 nous font comprendre le rôle exact de la souche de propagation de chaque phage.

Prenons par exemple le phage Co-g IV. Il a subi 11 passages sur la souche 909, et 6 seulement sur la souche 521/57. Or ce phage possède une bien meilleure efficacité d'étalement avec la souche 521/57 qu'avec la souche 909. Il semble donc que ce sont les derniers passages (sur 521/57) qui l'ont emporté.

Des observations analogues peuvent être faites avec les autres phages, y compris ceux qui sont des mélanges.

Nous pouvons en conclure que le phage « Cossonay » est très favorable à la typisation parce qu'il peut s'adapter facilement à une souche déterminée. Le phage Co-k, par exemple, est un phage Co-g IIIa adapté à la souche 909. On peut admettre que le phage Co-g IV est identique au phage Co-g IIIa. On peut alors faire la remarque suivante.

Le phage Co-k a une forte activité sur la souche 909, parce qu'il lui a été adapté. Or l'adaptation ne s'est pas faite seulement pour cette dernière souche, mais encore pour un certain nombre d'autres. Les souches suivantes, qui donnaient une réaction faible ou nulle avec le phage Co-g IV (voir tableau 26), en donnent une plus intense avec le phage Co-k : 55/b, 59, 60, 68, 76, 77, 78, 133, 152, 214, 521/57, 690, 714, 725, 726, 798, 799, 909 et 1114. Toutes ces souches ont donc quelque chose de commun dans leur comportement vis-à-vis du phage « Cossonay », quand bien même elles n'ont pas toutes la même sensibilité.

Ces résultats, si limités soient-ils, montrent cependant l'intérêt considérable que peut présenter la typisation par les bactériophages.

Ainsi que nous l'avons dit, la typisation peut être utilisée dans deux buts : la classification et l'épidémiologie.

Le principal argument de ceux qui s'opposent à l'emploi de la typisation en vue d'une classification est, à juste titre, que les groupes formés par ce moyen contiennent des bactéries dont les autres propriétés biologiques sont souvent très différentes ; de cette manière, les classifications classiques sont bouleversées. C'est le cas pour les mycobactéries, où la typisation nous oblige à mettre dans des groupes différents des souches portant le même nom (par exemple des *Mycob. smegmatis),* et à mettre dans un même groupe [**13**] des bactéries aussi différentes que *Mycob. avium* et une souche de *Mycob. smegmatis.* Mais la typisation par les phages a le grand avantage de donner une classification très complète ; la méthode est simple et peut être pratiquée par un laboratoire qui ne dispose pas d'installations compliquées ; les résultats sont obtenus rapidement et ne nécessitent pas d'interprétation.

L'intérêt de la typisation à des fins épidémiologiques est relativement limité en ce qui concerne les mycobactéries saprophytes. Par contre, il semble plus grand en ce qui concerne les mycobactéries pathogènes, mais, à notre connaissance, aucune tentative de typisation des bacilles tuber-

culeux n'a encore été faite. Il semble cependant que la chose est possible, puisqu'on possède maintenant un certain nombre de bactériophages capables de lyser ces germes.

A notre avis, la lysotypie des mycobactéries est assurée d'un grand avenir. Mais pour atteindre le but qu'elle se propose, elle doit d'abord être mise parfaitement au point. Pour cela, il est nécessaire que les efforts de tous les chercheurs soient coordonnés. L'isolement de bactériophages spécifiques et adaptables est l'une des premières étapes, à laquelle nous avons apporté une très modeste participation. La mise au point proprement dite exigera de plus longs travaux. Il est souhaitable qu'une commission internationale soit nommée dans ce but. L'établissement, pour les mycobactéries, d'un système de typisation par les phages aussi précis que celui qui est appliqué aux *Salmonella typhi* serait un progrès indiscutable dans la connaissance que nous avons des mycobactéries.

Phages adaptés.

Nous avons déjà signalé que le phage « Cossonay » possède un grand pouvoir d'adaptation (adaptation du phage « Cossonay » total et du phage à grandes plages).

Au cours d'un autre essai, nous avons pu montrer que le phage Co-p IV possède lui aussi cette qualité.

Une titration a été faite selon la méthode habituelle, au moyen de la souche 801 et du phage Co-p IV. Une des plages obtenues a été dissociée en bouillon, puis filtrée. Le filtrat a été ensemencé en culture aérée avec la souche 801. Au bout de 48 heures, le tout a été filtré, et le filtrat a reçu le nom de *Co-p IV (801)*.

On sait (voir tableau 16) que la souche 801 est 10'000 fois moins sensible au phage Co-p IV que la souche 17. Or, après deux passages seulement sur la souche 801, le phage Co-p IV acquiert un pouvoir lytique très élevé pour cette souche, puisqu'il l'attaque aussi facilement que la souche 17 :

Phages	*Efficacité d'étalement*	
	Souche 17	*Souche 801*
Co-p IV	1	1/10'000
Co-p IV (801)	1	1

Tableau 28
Adaptation du phage Co-p IV à la souche 801

On en conclut que le phage Co-p IV possède, lui aussi, une très grande faculté d'adaptation. C'est une preuve de plus que les phages « Cossonay » peuvent présenter un certain intérêt pour la lysotypie, puisqu'ils réunissent les qualités exigées des bactériophages utilisés dans ce but : ils possèdent des propriétés biologiques différentes des phages utilisés jusqu'à maintenant (leur origine particulière en est peut-être la cause), et ils sont facilement adaptables.

Sérologie

Les propriétés antigéniques des bactériophages ont été signalées déjà par d'Herelle en 1921 [**16**]. On s'est aperçu très tôt que les sérums antiphages possèdent un pouvoir d'inactivation sur les phages avec lesquels ils ont été préparés, ainsi que sur un certain nombre de souches voisines, tandis qu'ils n'inactivent pas les autres. Ces propriétés des sérums antiphages rendent possible une classification sérologique des bactériophages. En outre, elles permettent une grande quantité d'expériences diverses sur les phages ; en effet, ces sérums neutralisent uniquement les phages et non les bactéries infectées.

Les essais que nous avons faits avaient pour but de préciser les rapports existant entre les deux variétés de phage « Cossonay ».

Technique : l'animal de choix pour la production des sérums antiphages est le lapin. En principe, toutes les voies d'inoculation sont bonnes. Dans nos essais, nous avons injecté par voie sous-cutanée 6 doses de 5 cc de phage concentré (titre supérieur à 10^9), à raison de deux injections par semaine pendant 3 semaines. La prise de sang se fait au plus tôt une semaine après la dernière injection ; c'est à ce moment que le taux d'anticorps est le plus élevé. Nos essais ont été faits avec trois lapins, l'un recevant la variété Co-g IV, le second la variété Co-p IV et le troisième, à titre de comparaison, le « Phagus polonus ».

Un grand nombre de méthodes, sur lesquelles nous n'insisterons pas, ont été proposées pour l'étude des propriétés antiphages des sérums ainsi préparés. Certaines d'entre elles permettent d'obtenir des résultats extrêmement précis ; une telle précision n'est pas utile dans la pratique courante. Nous avons adopté une technique qui donne des résultats suffisamment exacts et faciles à interpréter. Il est du reste superflu de faire des calculs avec une précision supérieure à celle qu'on peut attendre en utilisant la technique de titration habituelle.

Après une série d'essais d'orientation, destinée à donner une première approximation du pouvoir inhibiteur des sérums préparés avec les trois sortes de phages, nous avons trouvé que la dilution la plus propice était 1/10. Pour les essais, les phages sont dilués en bouillon de façon à obtenir un titre compris entre 10^6 et 10^7 ; le titre exact est déterminé comme d'habitude.

Dans un tube stérile, on mélange 0,1 cc de phage et 0,9 cc de sérum dilué, puis on met le tube au bain-marie à 37°. De nouveaux essais d'orientation ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus quand le mélange est laissé pendant 2 heures à cette température. On sort ensuite le tube du bain-marie, et on fait des dilutions de 10 en 10, qui seront titrées ensuite sur la souche sensible (le sérum, à ce moment, est trop dilué pour avoir encore une action quelconque sur les phages).

Les phages Co-g IV, Co-p IV, Co-p IV (G) et « Ph. polonus » ont été essayés chacun avec les sérums anti Co-g IV, anti Co-p IV et anti « Ph. polonus ».

Résultats.

Nous donnons, dans le tableau suivant, la proportion de phages inhibés.

Phages	*Sérums*		
	anti Co-g IV	*anti Co-p IV*	*anti « Ph. polonus »*
Co-g IV	95,2 %	—	67,2 %
Co-p IV	—	—	—
« Ph. polonus »	96,4 %	—	96,1 %
Co-p IV (G)	—	—	—

Tableau 29

Discussion.

L'examen du tableau 29 permet de tirer les conclusions suivantes :

1) les phages Co-g IV et « Ph. polonus » sont inhibés par leurs antisérums respectifs.
2) le sérum préparé avec Co-p IV n'a d'action décelable sur aucun des phages examinés.
3) il existe une immunité croisée entre Co-g IV et « Ph. polonus ». Cette immunité croisée n'est pas symétrique, en ce sens que « Ph. polonus » est plus sensible au sérum anti Co-g IV que le phage Co-g IV ne l'est au sérum anti « Ph. polonus ».
4) aucun des trois sérums préparés n'a d'action décelable sur les phages Co-p IV et Co-p IV (G).

Nous pouvons considérer comme définitifs les résultats obtenus avec les sérums anti Co-g IV et anti « Ph. polonus », puisque ces sérums sont actifs sur les phages utilisés pour les préparer. Par contre, le sérum anti Co-p IV ne donne pas de résultats satisfaisants.

On sait que les lapins réagissent souvent très différemment à l'injection de bactériophages, et que, toutes choses étant égales par ailleurs, on pourra obtenir un sérum très actif avec un lapin, moins actif avec un autre, ou même totalement inactif avec un troisième. D'autre part, on sait également que certains phages ont un très faible pouvoir antigénique, quel que soit l'animal utilisé pour la préparation du sérum.

Afin de déterminer auquel de ces deux facteurs était due la mauvaise qualité du sérum anti Co-p IV, nous avons procédé à une deuxième série d'injections de ce phage, en employant deux lapins, et en utilisant, pour la dernière injection, une suspension d'un titre de 10^{11}/cc.

Les sérums ainsi préparés ont été essayés sur les 4 phages déjà indiqués. Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 30.

Phage	*Sérum anti Co-p IV II*	*Sérum anti Co-p IV III*
Co-g IV	38 %	33 %
Co-p IV	69 %	97 %
« Ph. polonus »	60 %	42 %
Co-p IV (G)	67 %	96 %

Tableau 30

Discussion.

L'examen du tableau ci-dessus confirme que, suivant l'animal utilisé, les résultats peuvent être bons ou mauvais. On peut tirer encore les conclusions suivantes :

1) le phage Co-p IV est un bon antigène à condition d'employer un animal réceptif.
2) le sérum anti Co-p IV est très actif sur le phage qui a servi à le préparer ; il a en outre une certaine activité sur les phages Co-g IV et « Ph. polonus ».
3) Co-p IV et Co-p IV (G) semblent être semblables au point de vue antigénique, puisqu'ils sont inactivés par le même sérum, et qu'ils sont insensibles à l'action des autres.
4) les phages Co-p IV et Co-g IV, différents par leur morphologie et par leur spectre d'action, sont aussi différents par leurs propriétés antigéniques.

Le tableau ci-dessous résume les résultats que nous avons déjà donnés sous une autre forme.

Phage	*Sérum anti Co-g IV*	*Sérum anti Co-p IV*	*Sérum anti « Ph. polonus »*
Co-g IV	+++	+	++
Co-p IV	–	+++	–
« Ph. polonus »	+++	+	+++
Co-p IV (G)	–	+++	–

Tableau 31

Réactions sérologiques

La classification des mycobactériophages

Le désir de toute personne ayant isolé un organisme nouveau est de pouvoir lui donner un nom, qui permettra à la fois de le distinguer de ceux qui ont déjà été isolés avant lui et de le rattacher à ceux dont il se rapproche par un ou plusieurs caractères. Les bactériophages étant des êtres vivants, il serait souhaitable de pouvoir les désigner selon la classification linnéenne.

D'Hérelle, en 1926 [**47**], admettait l'existence d'une seule espèce de bactériophage, douée d'un pouvoir d'adaptation très grand, à laquelle il donnait le nom de *Protobios bacteriophagus*. Par la suite, on s'aperçut de la grande diversité des bactériophages, et un certain nombre de classifications furent proposées.

En ce qui concerne les mycobactériophages, les travaux de Penso et Ortali[**12**] [**97**] ont fait faire un grand progrès à la classification.

Ces auteurs proposent un système de classification basé sur les caractéristiques suivantes :

1) inactivation du phage par un antisérum spécifique
2) morphologie du phage
3) activité du phage.

Pour les bactériophages utilisés par Ortali et Penso, le système de classification est remarquable : ces auteurs emploient une série de 5 antisérums différents, à savoir des sérums anti-phlei, anti-lacticola, anti-Rabinowitch, anti-smegmatis et anti-Pellegrino, qui inactivent spécifiquement les phages avec lesquels ils ont été préparés.

Il est probable que ce système pourrait être appliqué avec succès à tous les mycobactériophages isolés jusqu'à maintenant. Comme nous ne possédions pas ces antisérums spécifiques, nous n'avons malheureusement pas pu vérifier la validité de ce système pour les phages que nous avons étudiés.

Le deuxième point servant à la classification est la morphologie du phage. Les photographies que nous avons faites au microscope électronique montrent des morphologies qu'il est facile de comparer à celles des phages étudiés par Penso et Ortali :

Phages	*tête*	*queue*
Ph. phlei (Penso et Ortali)	allongée	250 — 300 mμ
Ph. lacticola (id.)	ronde	240 — 280 mμ
Ph. Rabinowitch (id.)	ronde	120 — 150 mμ
Ph. smegmatis (id.)	allongée	160 — 190 mμ
Ph. Pellegrini (id.)	ronde	150 — 160 mμ
Co-g IIIa (= Co-g IV)	allongée	250 mμ
Co-p IV	ronde	260 mμ

Tableau 32

Morphologie de quelques mycobactériophages.

Si l'on tient compte de la forme de la tête et de la longueur de la queue, le phage Co-g IIIa serait un « Ph. phlei », tandis que Co-p IV serait un « Ph. lacticola ».

Or, l'examen de l'activité des deux phages « Cossonay » semble donner tort à cette nomenclature. En effet, dans le système de classification de Penso et Ortali, les deux types sont très différents par leur spectre d'action. Le « Ph. phlei », par exemple, ne lyse pas *Mycob. smegmatis,* alors que Co-g IIIa peut attaquer les souches de cette espèce. D'autre part, les phages Co-g IIIa et Co-p IV attaquent les mêmes souches de *Mycob. phlei,* et ne peuvent pas lyser d'autres souches de ce germe. Enfin, le « Ph. lacticola » devrait attaquer les souches de *Mycob. lacticola ;* or la souche 522 est précisément *Mycob. lacticola,* mais elle n'est pas sensible à Co-p IV.

Nous sommes donc amené à admettre que le système préconisé par Penso et Ortali est incomplet ; ceci n'a du reste rien d'étonnant si on se rappelle qu'il a été proposé en 1949, tout au début de l'histoire des mycobactériophages, à une époque où ceux-ci étaient encore rares. Le mérite de ces deux auteurs est d'avoir proposé quelque chose là où rien n'existait encore. Ce système, pour incomplet qu'il soit, n'en demeure pas moins un excellent point de départ. Nous ne pouvons que répéter le souhait que nous avons fait à propos de la typisation, à savoir que les efforts des différents laboratoires soient coordonnés, afin d'arriver à un résultat satisfaisant. Remarquons que le problème de la classification des phages est exactement à l'opposé de la typisation, puisque dans le premier cas on cherche à classer les phages d'après les souches sensibles qui sont connues, alors que dans le second cas on utilise des phages connus pour classer des bactéries inconnues.

Avant de terminer cette étude, nous voudrions proposer d'utiliser une quatrième caractéristique en vue de la classification des phages, et qui s'ajouterait aux trois déjà proposées par Penso et Ortali. Il s'agit de la souche la plus sensible.

Nous avons dit que les phages s'adaptent souvent facilement à des souches bactériennes sur lesquelles leur action est faible au début ; quand un phage s'adapte à une nouvelle souche, son activité pour cette souche augmente dans des proportions notables ; en même temps, son activité pour des souches voisines augmente également, tandis que celle qu'il manifestait pour d'autres demeure la même ou peut même s'affaiblir.

Il est intéressant de noter que la souche 17 s'est, dès le début, montrée très sensible au phage « Cossonay », et que cette sensibilité n'a pas varié au cours des différents essais qui ont été faits.

Cette haute sensibilité de la souche 17 aux phages « Cossonay » peut s'expliquer, à notre avis, de deux façons : 1) les phages ont été en contact, à un moment donné, avec cette souche, et s'y sont adaptés ; 2) les phages avaient, à l'origine, une sensibilité élevée pour cette souche.

Il est difficile de trancher la question ; en effet, l'histoire d'un bactériophage n'est connue que dès le moment où il a été isolé. Dans le cas

particulier, nous savons que nous n'avons fait aucun passage des phages « Cossonay » sur la souche 17.

Quelle que soit la raison pour laquelle les phages « Cossonay » montrent une activité élevée sur la souche 17, on doit considérer ce fait comme important. Or la souche 17 est *Mycob. ranae*. Nous avons la chance que ce soit une bactérie connue et déjà pourvue d'un nom complet, ce qui est loin d'être le cas de toutes les mycobactéries.

Si le pouvoir lytique élevé manifesté par le phage « Cossonay » sur la souche 17 est dû à son adaptation à cette souche, cette adaptation s'est produite vraisemblablement dans le corps de la larve de moustique (dernier contact avec des mycobactéries avant l'isolement) ; il faudrait donc admettre que la larve était porteuse de *Mycob. ranae ;* la chose est d'autant plus probable que cette espèce de mycobactéries est très répandue dans la nature, non seulement chez les grenouilles et certains animaux à sang froid, mais encore dans la terre, les eaux, etc. Remarquons encore la présence fréquente, dans un même milieu, des grenouilles et des larves de moustiques.

Si ce pouvoir lytique élevé pour la souche 17 est une propriété naturelle du phage « Cossonay », il y a une raison encore plus valable de donner à ce phage le nom de la souche la plus sensible.

Le nom du phage « Cossonay » serait donc *Phagus ranae,* auquel viendrait s'ajouter un nom de variété permettant de distinguer Co-p IV de Co-g IV. Mais il est possible que d'autres phages possèdent le pouvoir le plus élevé pour cette souche 17, tout en ayant par ailleurs d'autres propriétés. Remarquons enfin que nous n'avons pas essayé toutes les souches de mycobactéries avec le phage « Cossonay », et que la souche 17 n'est peut-être pas réellement la souche la plus sensible. Dans ce cas, le nom *Phagus ranae* ne serait pas justifié.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il est plus prudent de conserver le nom que nous avons utilisé dès le début pour désigner nos phages (« Cossonay »), ce nom ayant l'avantage de n'être suggéré que par des faits connus et non par des hypothèses.

Résumé

L'absence d'une classification complète et satisfaisante des mycobactéries est une des lacunes de la bactériologie moderne. La découverte des mycobactéries dites « atypiques » rend encore plus nécessaire la mise au point d'une méthode simple, à la portée de tous les laboratoires, permettant de classer dans un certain nombre de groupes toutes les mycobactéries connues à l'heure actuelle, ainsi que celles qui pourraient être isolées par la suite.

La découverte de souches de bactériophages capables de lyser tous les types de mycobactéries permettra peut-être d'établir un système de classification parmi celles-ci.

La typisation par les bactériophages a déjà été employée avec succès en effet pour d'autres germes.

Le but général de notre travail a été d'étudier un certain nombre de propriétés physiques et biologiques de diverses souches de mycobactériophages isolées soit par nous-même soit par d'autres auteurs et de voir si elles étaient utilisables dans une tentative de classification des mycobactéries.

Nous rappelons que la découverte du bactériophage a été faite par d'Hérelle en 1917 et que le premier mycobactériophage a été isolé en 1947 par Gardner et Weiser. Peu de temps après, Hauduroy et Rosset en isolaient un autre. Mais ces bactériophages ne paraissaient être actifs que sur les bacilles dits « paratuberculeux ».

En 1953, Froman et Bogen ont isolé un bactériophage capable de lyser les bacilles tuberculeux authentiques. En 1957, Takeya et Yoshimura ont réussi à isoler un bactériophage très polyvalent s'attaquant aussi bien aux mycobactéries pathogènes pour l'homme et les animaux (dont les oiseaux) qu'aux mycobactéries dites saprophytes.

Les techniques d'étude des bactériophages et plus particulièrement des mycobactériophages sont nombreuses et varient souvent avec les expérimentateurs. Nous avons donc décrit d'une façon aussi précise que possible celles que nous avons utilisées : milieu de culture pour l'entretien des souches bactériennes, technique de fabrication du bactériophage, numération des éléments de bactériophage, méthodes de conservation du produit.

Nous décrivons enfin un appareil permettant de compter facilement les plages formées sur les milieux de culture solides.

Nous avons recherché des mycobactériophages à partir d'échantillons de matériel de provenances très diverses. Alors que les essais faits à partir de la terre, d'expectorations, de selles humaines, d'excréments de cobayes et de hamsters, de fumier et d'eaux ont tous été négatifs, un bactériophage actif sur un grand nombre de souches de mycobactéries a pu être isolé du tube digestif d'une larve de *Culex pipiens*. Nous lui avons donné le nom de bactériophage « Cossonay » (lieu où il a été isolé).

Ces résultats nous amènent à penser que les mycobactériophages sont extrêmement rares dans les régions où les prélèvements ont été faits. Nous ne pensons pas que les techniques employées aient été à l'origine des échecs. Elles ont en effet donné des résultats positifs entre les mains d'autres expérimentateurs.

Nous nous sommes d'abord assuré que le principe isolé de la larve de *Culex pipiens* était bien un bactériophage. Il en possède en effet toutes les qualités : lyse en série de cultures bactériennes, formation de plages claires sur les milieux solides, etc., et enfin, preuve encore plus formelle, morphologie typique au microscope électronique.

Ce bactériophage semble s'attaquer spécifiquement aux mycobactéries. Nous avons en effet étudié son spectre d'action et constaté qu'il ne lyse aucun des microbes soumis à son action appartenant aux genres suivants : *Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Corynebacterium, Diplococcus, Escherichia, Salmonella, Proteus* et *Shigella.*

Le bactériophage « Cossonay » peut lyser un certain nombre de bacilles tuberculeux humains. Il est par contre sans action sur les bacilles tuberculeux bovins

et aviaires employés. Il attaque enfin un grand nombre de mycobactéries « saprophytes ».

Le bactériophage « Cossonay » supporte parfaitement la congélation à basse température (—70° environ). Par contre, il supporte mal la lyophilisation, car, dans les meilleures conditions, la perte d'éléments vivants à la suite de ce traitement atteint 85,5 %. Dans l'état actuel de nos connaissances, la lyophilisation ne donne pas, pour le bactériophage « Cossonay », des résultats meilleurs que la conservation simple en milieu liquide, à la glacière.

Le chloroforme, dont on sait l'action destructrice sur les microbes, n'a par contre pas d'action sur les bactériophages actifs sur les entérobactéries. Il est souvent utilisé pour la « purification » des lysats, permettant ainsi d'éviter la filtration. Le bactériophage « Cossonay » se trouve être, lui, très sensible à l'action du chloroforme, ce qui interdit son emploi dans le même but.

Le Tween 80, agent tensio-actif utilisé dans le milieu de Dubos, empêche le phage « Cossonay » d'exercer son action. Cette sensibilité au Tween a déjà été constatée pour d'autres mycobactériophages, ainsi que pour des bactériophages actifs sur les corynébactéries.

Nous avons observé des anomalies dans la dimension des plages formées par le phage « Cossonay » sur des souches sensibles et dans les valeurs trouvées pour les titres de diverses préparations de ce même phage. Nous en avons cherché l'explication.

Deux hypothèses pouvaient être formulées pour les expliquer. Il pouvait s'agir soit d'un « mélange de germes » dans la souche bactérienne soit d'un « mélange de phages » dans la souche « Cossonay ».

L'expérience a montré que ces deux hypothèses étaient fondées.

Trois souches de mycobactéries (521, 908 et 909) se sont révélées en effet hétérogènes vis-à-vis du phage « Cossonay » : les éléments qui les composaient ne réagissaient pas de la même façon, les uns étant très sensibles, d'autres moyennement ou peu sensibles.

D'autre part, une étude des propriétés du bactériophage « Cossonay » nous a fait découvrir que celui-ci était un mélange de deux mycobactériophages.

De nombreux isolements effectués en série à partir de plages claires ont permis en effet de les séparer l'un de l'autre. Nous avons nommé l'un « p » (petites plages) et l'autre « g » (grandes plages).

Nous avons pu mettre en évidence de grandes différences entre certains de leurs caractères biologiques et physiques.

En voici quelques exemples.

Sur 151 souches de mycobactéries qui ne sont pas des bacilles tuberculeux authentiques, 47 sont sensibles à « p », 42 sont sensibles à « g », 104 résistent à « g » et à « p » ; 5 sensibles à « p » résistent à « g » ; la plupart des souches sensibles à « p » et à « g » le sont d'une façon différente : faible sensibilité à « p », grande sensibilité à « g », ou inversément. Morphologie différente des plages. Sensibilité différente au chauffage, etc.

L'existence des deux variétés « p » et « g » dans le « complexe » bactériophagique « Cossonay », démontrée biologiquement par les essais que nous venons de résumer, est formellement confirmée par l'étude que nous avons faite au microscope électronique.

En effet, après avoir décrit les méthodes de concentration du bactériophage et de préparation des porte-objets, nous apportons les documents photographiques prouvant la différence morphologique existant entre « p » et « g ».

Tous deux se présentent comme des bactériophages, mais si la tête de « p » est parfaitement sphérique, celle de « g » est nettement allongée.

La séparation de « g » et « p » étant faite, nous avons cependant constaté l'apparition en minime proportion de grandes plages parmi les petites plages dues à l'action du seul mycobactériophage « p ». Nous nous sommes demandé si une erreur ne s'était pas produite dans nos essais et si nous avions réellement séparé d'une façon définitive les deux variétés de bactériophage.

Les contrôles morphologiques, biologiques et antigéniques entrepris ont montré

que le bactériophage « p » était réellement pur. Nous pensons que l'apparition de quelques grandes plages au milieu des petites plages produites par « p » est due probablement à une mutation, aucune autre explication ne paraissant satisfaisante à l'heure actuelle.

Nous avons fabriqué plusieurs sérums neutralisants anti-mycobactériophages en utilisant les variétés « p » et « g » isolées par nous et le « Phagus polonus » isolé en Pologne. Les résultats de nos essais montrent en particulier que « p » est sérologiquement différent de « g », que les sérums « Polonus » et « g » neutralisent respectivement les bactériophages « g » et « Polonus » ; cette neutralisation, tout en étant nette, n'a jamais été absolue.

Les trois variétés de mycobactériophages étudiées dans ce travail ne peuvent évidemment constituer à elles seules les bases techniques d'un système de typisation.

Mais le fait que les variétés « p » et « g » du bactériophage « Cossonay », ainsi que le bactériophage « Polonus » possèdent un bon pouvoir d'adaptation, qu'ils ont pour chacun d'eux un spectre d'action différent, que ces spectres ne sont pas les mêmes que ceux des bactériophages utilisés par Froman dans ses essais, nous font penser qu'on pourrait utilement les adjoindre aux bactériophages déjà utilisés pour la typisation.

Une dernière question s'est posée à nous. Quels noms conformes aux règles de la nomenclature doit-on donner aux variétés de bactériophage isolées par les chercheurs ?

Plusieurs systèmes ont été proposés. En particulier en 1949, Penso et Ortali ont suggéré des désignations basées sur la morphologie, l'activité et les propriétés antigéniques : *Phagus phlei, lacticola, Rabinowitch, smegmatis, Pellegrini*. Nous montrons que ce système n'est pas applicable aux phages « p » et « g ».

Il semble donc que, pour le moment et faute de mieux, on doive se contenter de désigner chaque phage par son lieu d'isolement.

Bibliographie

1. Hauduroy, P. : Derniers aspects du monde des Mycobactéries. Masson, Paris, 1955.
2. Pinner, M. : Atypical acid-fast microorganims. *Amer. Rev. Tuberc.* 1935, **32**, 424.
3. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R. : Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed. Baillère, Tindall & Cox, Ltd, London, 1957.
4. Dubos, R. and Middlebrook, G. : Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 1948, **58**, 698.
5. Desbordes, J. : Mise en évidence *in vitro* de la « non virulence » de germes a.a.r. par une réaction au bleu de Nil. *Ann. Inst. Pasteur* 1952, **83**, 809.
6. Wilson, F. J., Kalish, C. and Fish, C. H., Use of oxidation-reduction dyes in the determination of virulence of mycobacteria in vitro. *Amer. Rev. Tuberc.* 1952, **65**, 187.
7. Alexander-Jackson, E. : A differential triple stain for demonstrating and studying non-acid-fast forms of the tubercle bacillus in sputum, tissue and body fluids. *Science* 1944, **99**, 307.
8. Middlebrook, G., Dubos, R. and Pierce, C. : Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. exp. Med.* 1947, **86**, 175.
9. Middlebrook, G. : Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 1954, **69**, 471.
10. Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K. T. and Sbarra, A. : Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 1958, **77**, 669.
11. Sonnenschein, C. : Die Verwendbarkeit der Bakteriophagie für die bakteriophagische Diagnose. *Münch. med. Wschr.* 1925, **72**, 1443.
12. Penso, G. e Ortali, V. : Studi e ricerche sui micobatteri, nota II. I fagi dei micobatteri. *R. C. Ist. sup. Sanità* 1949, **12**, 903.
13. Froman, S. : Bacteriophage typing of non-tuberculous acid-fast bacilli. *(Personal commun.)* 1959.
14. Twort, F. W. : An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 1915, **2**, 1241.
15. d'Hérelle, F. : Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci.* 1917, **165**, 373.
16. d'Hérelle, F. : Le bactériophage. Son rôle dans l'immunité. Masson, Paris, 1921.
17. Varrier-Jones, P. : Atmospheric pollution in relation to tuberculosis. *Dis. Chest* 1938, **4**, 8.

18. Gardner, G. M. and Weiser, R. S. : A bacteriophage for Mycobacterium smegmatis. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 1947, **66**, 205.

19. Hauduroy, P. et Rosset, W. : Un bactériophage lysant certaines mycobactéries. *C. R. Acad. Sci.* 1948, **227**, 917.

20. Ortali, V. : Isolamento di tre batteriofagi anti-micobatterici. *R. C. Acc. naz. Lincei (ser. VIII)* 1948, **4**, 790.

21. Penso, G. e Ortali, V. : Isolamento e studio di fagi attivi sui micobatteri. *R. C. Acc. naz. Lincei (ser. VIII)* 1949, **6**, 109.

22. Whittaker, E. : Two bacteriophages for Mycobacterium smegmatis. *Canad. J. pub. Hlth* 1950, **49**, 431.

23. Hnakto, S. I. : Studies on bacteriophages for Mycobacteria. *M. A. thesis,* Toronto, 1951.

24. McLaren, L. D. : Studies on Mycobacterium phage. *M. A. thesis,* Los Angeles, 1953.

25. Froman, S. and Bogen, E. : Mycobacteriophage. *Tr. nat. Tuberc. A.* 1953.

26. Macander, W. : Badania nad dzialaniem bakteriofaga na saprofityczne pratki kwasooporne. *Gruzlica* 1954, **22**, 691.

27. Choremis, C., Pantazis, S. et Strombou, S. : Suite à nos études sur le bactériophage isolé dans notre clinique et ayant une action spécifique sur le bacille de Koch. *Arch. Inst. Pasteur hellénique* 1955, **1**, 15.

28. Takeya, K. and Yoshimura, T. : Isolation of bacteriophage active against all types of Mycobacterium tuberculosis. *J. Bact.* 1957, **74**, 540.

29. Vandra, E. and Gál, F. : Isolation of phages active against mycobacteria. *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* 1958, **5**, 43.

30. Hikawa, Y. : Studies on mycobacteriophage. *Kekkaku* 1959, **34**, 508.

31. Gratia, A. : Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur* 1936, **57**, 652.

32. Froman, S., Will, D. W. and Bogen, E. : Bacteriophage active against virulent Mycobacterium tuberculosis. I. Isolation and activity. *Amer. J. publ. Hlth* 1954, **44**, 1326,

33. Bottcher, E. J. and Hofer, A. W. : Semi-quantitative determinations of bacteriophage in soils. *J. Bact.* 1943, **45**, 407.

34. Hnakto, S. I. : The isolation of bacteriophages for Mycobacteria with reference to phage typing of the genus. *Canad. J. med. Sci.* 1953, **31**, 462.

35. Bowman Jr, B. U. and Redmond, W. B. : A temperate bacteriophage from Mycobacterium butyricum. *Amer. Rev. resp. Dis.* 1959, **80**, 232.

36. Segawa, J., Takeya, K. and Sasaki, M. : Isolation of lysogenic acid-fast bacilli from the soil. *Amer. Rev. resp. Dis.* 1960, **81**, 419.

37. Jacob, F. : Les bactéries lysogènes et la notion de provirus. Masson, Paris, 1954.

38. Penso, G. : *(Commun. pers.) cit.* Chavez Mora, E. : Phage-host relationships in the Mycobacteria. *Ph. D. Diss.*, Kansas State Coll. 1959.

39. Chavez Mora, E. : Phage-host relationships in the Mycobacteria. *Ph. D. Diss.*, Kansas State Coll. 1959.

40. Takeya, K., Yoshimura, T., Yamaura, K. and Toda, T. : Studies on the biologic properties of Mycobacteriophage. *Amer. Rev. resp. Dis.* 1959, **80**, 543.

41. Violle, H. et Sautet, G. : Contribution à l'étude du colibacille chez le « Culex pipiens », race autogène des fosses septiques. *C. R. Soc. Biol.* 1937, **126**, 368.

42. Violle, H. et Sautet, G. : Etude du pouvoir bactéricide du Culex pipiens, race autogène, vis-à-vis du Colibacille. *C. R. Soc. Biol.* 1938, **127**, 81.

43. Ranque, J. : Etude comparée du pouvoir bactéricide de diverses nymphes de Culicidés vis-à-vis de *Escherichia coli*. *C. R. Soc. Biol.* 1951, **145**, 1571.

44. Dubos, R. and Middlebrook, G. : Media for tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 1947, **56**, 334.

45. White, A. and Knight, V. : Effect of Tween 80 and serum on the interaction of Mycobacteriophage D-29 with certain mycobacterial species. *Amer. Rev. Tuberc.* 1958, **77**, 134.

46. White, A. and Knight, V. : A factor in serum albumin which prevents the inhibition of propagation of D-29 Mycobacteriophage by Tween. *Amer. Rev. resp. Dis.* 1959, **80**, 443.

47. d'Hérelle, F. : The bacteriophage and its behavior. Williams & Wilkins, Baltimore, 1926.

48. Lazarus, A. S. and Gunnison, J. B. : Action of *P. pestis* phage on strains of Pasteurella, Salmonella and Shigella. *J. Bact.* 1947, **53**, 705.

49. Hauduroy, P. : Inventaire et description des bacilles paratuberculeux. Masson, Paris, 1946.

50. Dentan, A. : Etudes sur la virulence des Mycobactéries. *Thèse Méd.*, Lausanne, 1957.

51. Bablet, J., Van Deinse, F. et Schwartz, F. : Sur un bacille acido-alcoolo-résistant isolé d'eau de Seine. *C. R. Soc. Biol.* 1938, **128**, 350.

52. Sansonnens, R. : Le pouvoir pathogène naturel et expérimental des bacilles paratuberculeux. *Thèse Méd.*, Lausanne, 1946.

53. Andrejew, A. : Contribution à l'étude du métabolisme respiratoire des bacilles paratuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur* 1946, **72**, 611.

54. Kondo, S. : Der Verwendungsstoffwechsel der sogenannten Leprabacillen. *Z. Hyg. InfektKr.* 1925, **104**, 714.

55. Karlinski, J. : Zur Kenntnis der säurefesten Bakterien. *Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.)* 1901, **29**, 521.

56. Joubert, L. et Fujiwara, K. : Avirulence d'une souche de bacille acido-résistant *(Mycobacterium chelonei* 5541) pour l'embryon de poulet et le cobaye adulte. *Ann. Biol. clin.* 1959, **17**, 225.

57. Sartory, A., Schuster, G. et Desbordes, J. : Contribution à l'étude d'un bacille para-tuberculeux (bacille F 3). *Ann. Biol. clin.* 1950, **8**, 299.

58. Tobie, W. C. : « Mycobacterium tuberculosis N° 607 » and similar doubtful tubercle bacilli. A review. *Amer. Rev. Tuberc.* 1948, **58**, 693.

59. Hubácek, J. a Málek, I. : Fotochromogenní mykobakteria, jejich imunologické vlastnosti a vztah k virulentním, avirulentním a saprofytickym mykobakteriím. *Rozhl. Tuberk.* 1958, **18**, 740.

60. Cullell Reig, R. : Estudio comparado de los « bacilos de los grifos ». *Publ. Inst. antituberc. « Francisco Moragas »* 1943, **5**, 7.

61. Wells, A. Q., Agius, E. and Smith, N. : Mycobacterium fortuitum. *Amer. Rev. Tuberc.* 1955, **72**, 53.

62. Agius, E. : An uncommon pathogenic Mycobacterium. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis* 1956, **33**, 245.

63. Leach, R. H., Ohye, D. F. and Scott, W. J. : The death of micro-organisms during drying in relation to solute concentration and drying temperature. *J. gen. Microbiol.* 1959, **21**, 658.

64. Fredericq, P. : Technique simple et rapide de culture et de conservation des entérobactériophages. *C. R. Soc. Biol.* 1950, **144**, 295.

65. Groman, N. B. and Bobb, D. : The inhibition of adsorption of Corynebacterium diphteriae phage by Tween 80. *Virology* 1955, **1**, 313.

66. Bobb, D. and Groman, N. B. : The effect of non-ionic surface active agents on « Corynebacterium diphteriae » phage adsorption. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **26**, 648.

67. Nicolle, P. : Sur une cause importante d'erreur dans le titrage d'un bactériophage. Cas des suspensions bactériennes non homogènes. *Ann. Inst. Pasteur* 1943, **69**, 13.

68. Ellis, E. L. and Delbrück, M. : The growth of bacteriophage. *J. gen. Physiol.* 1938, **22**, 365.

69. Luria, S. E., Williams, R. C. and Backus, R. C. : Electron micrographic counts of bacteriophage particles. *J. Bact.* 1951, **61**, 179.

70. Luria, S. : Méthodes statistiques appliquées à l'étude du mode d'action des ultra-virus. *Ann. Inst. Pasteur* 1940, **64**, 415.

71. Gratia, A. : De la signification des « colonies de bactériophage » de d'Hérelle. *C. R. Soc. Biol.* 1921, **84**, 753.

72. Gratia, A. : Dissociation d'une souche de Colibacille en deux types d'individus de propriétés et de virulence différentes. *C. R. Soc. Biol.* 1921, **84**, 751.

73. Hauduroy, P. : L'hétérogénéité possible des populations bactériennes. *Rev. Immunol.* 1959, **23**, 54.

74. Hauduroy, P. : Sur un appareil « séparateur de germes » pouvant dans certains cas remplacer les micromanipulateurs. *Ann. Inst. Pasteur* 1949, **77**, 307.

75. Hauduroy, P. : Le « séparateur de germes ». *Experientia* 1951, **7**, 193.

76. Cevey, M. : Contribution à l'étude des Mycobactéries. *Thèse Méd.*, Lausanne, 1953.

77. Hauduroy, P. et Wachsmuth, C. : Démonstration directe de l'hétérogénéité des souches de bacilles tuberculeux vis-à-vis des isoniazides. *Ann. Inst. Pasteur* 1957, **93**, 276.

78. Hauduroy, P. et Wachsmuth, C. : Diversité de la résistance aux isoniazides des germes contenus dans des souches de Mycobactéries. *Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.* 1957, **13**, 535.

79. Elford, W. J. and Andrewes, C. H. : The size of different bacteriophages. *Brit. J. exp. Path.* 1932, **13**, 446.

80. Fredericq, P. : Une mutation de bactériophage intéressant son spectre d'activité. *C. R. Soc. Biol.* 1950, **144**, 1140.

81. Fredericq, P. : Mutations intéressant le spectre d'activité du bactériophage T.1. *C. R. Soc. Biol.* 1950, **144**, 1258.

82. Adams, M. H. : Bacteriophages. Interscience Publishers, New-York/ London, 1959.

83. Swanstrom, M. and Adams, M. H. : Agar layer method for production of high titer phage stocks. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 1951, **78**, 372.

84. Kellenberger, E. and Kellenberger, G. : The process of filtration on agar used for electron microscopical studies of bacteriophages in lysates and in single bacterial bursts. *Proc. int. Conf. electron Microscopy London*, 1954, 268.

85. Nicolle, P. : Les bactériophages et la lysotypie. *Rev. franç. Et. clin. biol.* 1957, **2**, 929.

86. Piguet, J.-D. : Présence de deux variétés distinctes dans une souche de mycobactériophage. *Ann. Inst. Pasteur* 1960, **98**, 147.

87. Hastings, E. G. and McCarter, J. : Misnamed cultures and studies of the tubercle bacillus. *Science* 1932, **75**, 513.

88. Craigie, J. and Yen, C. H. : The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of type II Vi phage. 1. Principles and technique. *Canad. publ. Hlth J.* 1938, **29**, 448.

89. Craigie, J. and Yen, C. H. : The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of type II Vi phage. 2. The stability and epidemiological significance of V form types of *B. typhosus*. *Canad. publ. Hlth J.* 1938, **29**, 484.

90. Latarjet, R. : Mutation induite chez un virus par irradiation ultraviolette de cellules infectées. *C. R. Acad. Sci.* 1949, **228**, 1354.

91. Latarjet, R. : Mutations induites chez un bactériophage. *Acta Un. int. Cancr.* 1954, **10**, 136.

92. Felix, A. and Callow, B. R. : Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Brit. med. J.* 1943, **2**, 127.

93. Lilleengen, K. : Typing of Salmonella typhi murium by means of bacteriophage. *Acta path. microbiol. scand.* 1948, *suppl.* **78**.

94. Wilson, G. S. and Atkinson, J. D. : Typing of Staphylococci by the bacteriophage method. *Lancet* 1945, **1**, 647.

95. Thibaut, J. et Fredericq, P. : Recherches sur la classification des souches de *Corynebacterium diphteriae* type *gravis* d'après leur sensibilité à divers bactériophages. *C. R. Soc. Biol.* 1956, **150**, 1039.

96. Nicolle, P., Le Minor, L., Buttiaux, R. et Ducrest, P. : Lysotypie des « Escherichia coli » isolés dans les gastro-entérites infantiles. I. Schéma des types actuellement individualisés. II. Fréquence relative des types dans différents foyers et valeur épidémiologique de la méthode. *Bull. Acad. nat. Méd.* 1952, **136**, 480.

97. Ortali, V. e Penso, G. : Studi e ricerche sui micobatteri. Nota V. Sul riconoscimento specifico di un fago antimicobatterico e sulla possibilità di diagnosticare la specie di un fago. *R. C. Ist. sup. Sanità* 1949, **12**, 930.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

Histoire des bactériophages, et plus particulièrement des mycobactériophages 8

Techniques générales employées pour l'étude des mycobactériophages 10

a) Milieux de culture 10
b) Numération des bactériophages 11
c) Préparation des stocks de bactériophage 13

Recherche de mycobactériophages 14

Généralités 14
Essais personnels 17
A. Terre 17
B. Expectorations 18
C. Selles humaines 18
D. Excréments de cobayes et de hamsters 18
E. Fumier 18
F. Eaux de diverses provenances 18
Discussion des résultats des essais A à F 19
G. Larves de *Culex pipiens* 21
généralités 21
technique de recherche dans les larves 22
résultats 22
discussion 24

Etude du bactériophage « Cossonay » 27

a) Vérification de la nature du principe lytique isolé 27
b) Spectre d'action 27
A. Germes autres que les mycobactéries 28
B. Bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires 28
C. Mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux 29
Liste des mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux citées dans cette étude 30

c) Quelques propriétés physiques du bactériophage « Cossonay » . 37
A. Actions de la congélation et de la dessiccation 37
1) congélation 39
2) dessiccation 40
B. Sensibilité au chloroforme 43
C. Influence du Tween 80 44

d) Propriétés biologiques du bactériophage « Cossonay » . . . 45
A. Hypothèse d'un mélange de germes 49
1) essais avec la souche 908 51
résultats 51
discussion 52
2) essais avec la souche 909 57
résultats 58
discussion 58
3) essais avec la souche 521 59
résultats 59
discussion 60
B. Hypothèse d'un mélange de bactériophages 61
1) essais de séparation avec un séparateur de germes . 61
2) essais de séparation au moyen d'une méthode biologique 62
3) préparation de stocks de phages séparés 67
discussion 67

Etude des variétés à grandes et à petites plages du bactériophage « Cossonay » 69

a) Examen au microscope électronique 69
A. Méthodes de concentration 69
1) évaporation sous vide 69
2) centrifugation 69
3) culture en milieu semi-solide 70
B. Préparations pour la microscopie électronique 70
1) méthode simple 70
2) microdialyse 71
3) filtration sur agar 71
C. Résultats des essais personnels 71
Discussion 72
b) Spectre d'action des bactériophages Co-p IV et Co-g IIIa . . 73
c) Etude détaillée de l'action de diverses préparations de phage « Cossonay » et de *Ph. polonus* sur 32 souches de mycobactéries 78
Résultats 81
Discussion 80
Efficacité d'étalement 85
Discussion 86
Phagus polonus : morphologie des plages 93
Discussion 93
d) Sensibilité à la chaleur 94
e) Filtrabilité 97
Discussion 101
f) Vérification de la pureté des deux variétés isolées 101

La typisation appliquée aux mycobactéries 107
Lysotypie par les phages non adaptés 107
Lysotypie par les phages adaptés 107
Cas des mycobactéries 110
Possibilité de l'emploi des phages « Cossonay » et de « Phagus polonus » dans un système de typisation 112
Test de dilution critique 113
Résultats 114
Discussion 114
Phages adaptés 118

Sérologie 119
Technique 119
Résultats 119
Discussion 120
Discussion des nouveaux résultats 121

La classification des mycobactériophages 122

RÉSUMÉ 125

BIBLIOGRAPHIE 128

TABLE DES MATIÈRES 134